



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ  
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΔΙΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
"ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ"

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Προσδιορισμός δομής, διαμορφωτικές ιδιότητες και  
ανακάλυψη πιθανών στόχων του παραγώγου του κινναμικού  
οξέος NGI25**

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΣΚΟΥΦΑΣ  
ΧΗΜΙΚΟΣ

Επιβλέπων: Θωμάς Μαυρομούστακος

ΑΘΗΝΑ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2026



**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Προσδιορισμός δομής, διαμορφωτικές ιδιότητες και  
ανακάλυψη πιθανών στόχων του παραγώγου του κινναμικού  
οξέος NGI25**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΣΚΟΥΦΑΣ**

**A.M.: 191521**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- 1. Θωμάς Μαυρομούστακος, Επιβλέπων Καθηγητής**
- 2. Σταματία Βασιλείου, Καθηγήτρια**
- 3. Χρήστος Χασάπης, Επίκουρος Καθηγητής**

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 02/2026**



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ταυτοποίηση και η διαμορφωτική ανάλυση του παραγώγου της κινναμικής N-βενζυλο-N-(2-(κυκλοεξυλαμινο)-2-οξοαιθυλο) κινναμαμίδης (NGI25) πραγματοποιήθηκε μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), μοριακής δυναμικής (MD) και κβαντικής μηχανικής (QM), δηλαδή ημιεμπειρικούς υπολογισμούς και υπολογισμούς πυκνότητας λειτουργικής θεωρίας (DFT). Επιπλέον, εφαρμόστηκαν ομοπυρηνικά (COSY, NOESY) και ετεροπυρηνικά (HSQC, HMBC) πειράματα για τον προσδιορισμό των πρωτονίων και των ατόμων άνθρακα. Μετά την ταυτοποίηση της δομής, το NGI25 υποβλήθηκε σε υπολογιστικές μελέτες για να αποκαλυφθούν οι πιο ευνοϊκές διαμορφώσεις του. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν μελέτες MD σε δύο διαφορετικούς διαλύτες, DMSO μέσης πολικότητας και τον υδρόφοβο διαλύτη του χλωροφορμίου. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν υποδηλώνουν ότι το μόριο NGI25 υιοθετεί παρόμοιες διαμορφώσεις και στα δύο περιβάλλοντα. Συγκεκριμένα, οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι του μορίου βρίσκονται σε χωρική γειτνίαση, ενώ παραμένουν αρκετά απομακρυσμένοι από το κυκλοεξάνιο. Τα πειράματα 2D NOESY επιβεβαίωσαν τους υπολογισμούς *in silico* MD και QM. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί μοριακής πρόσδεσης προκειμένου να αποκαλυφθούν πιθανοί ενζυμικοί στόχοι για το NGI25. Χρησιμοποιήθηκε η πλατφόρμα Swiss target για να καθοδηγήσει την ανακάλυψη νέων στόχων με βάση τη δομή του NGI. Πράγματι, προβλέφθηκε ότι το NGI25 αναστέλλει τη βουτυρυλοχολινεστεράση (BCHE) και τη λιποξυγονάση (LOX). Πειράματα μοριακής πρόσδεσης, ακολουθούμενα από μελέτες μοριακής δυναμικής, επιβεβαίωσαν την ευνοϊκή σύνδεση του NGI25 και με τα δύο ένζυμα.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Ανακάλυψη καινοτόμων Φαρμακευτικών Μορίων

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** Αναλόγο κινναμικού οξέος; σύνθεση; Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού; μοριακή δυναμική; μοριακή πρόσδεση

## ABSTRACT

The structure assignment and conformational analysis of cinnamic derivative N-benzyl-N-(2-(cyclohexylamino)-2-oxoethyl) cinnamamide (NGI25) was carried out through Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy, Molecular Dynamics (MD) and Quantum Mechanics (QM), i.e. semiempirical and Density Functional Theory (DFT) calculations. Moreover, Homonuclear (COSY, NOESY) and heteronuclear (HSQC, HMBC) experiments were applied to assign its protons and carbons. After structure identification, NGI25 was subjected to computational calculations to reveal its most favorable conformations. In particular, MD studies were performed in two different solvents, DMSO of intermediate polarity and hydrophobic CHCl<sub>3</sub>. The obtained results suggest that NGI25 adopts similar conformations in both environments. In particular, the two aromatic rings of the molecule reside in spatial vicinity, while they remain quite distant from the cyclohexane. 2D NOESY experiments confirmed the *in silico* MD and QM calculations. Finally, molecular docking calculations were performed in order to reveal possible enzyme-targets for NGI25. Swiss target module was used to guide the discovery of new targets based on the structure of NGI. Indeed, it was predicted that NGI25 inhibited butyrylcholinesterase (BCHE) and lipoxygenase (LOX). Molecular docking experiments, followed by Molecular Dynamics studies, confirmed the favorable binding of NGI25 to both enzymes.

**SUBJECT AREA:** Discovery of novel pharmaceutical molecules

**KEYWORDS:** Cinnamic analog; synthesis; spectroscopy; molecular dynamics; molecular docking



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Επιθυμώ να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην τριμελή επιτροπή για τον κόπο και την προσπάθεια τους να διορθώσουν τα λάθη του κειμένου.

Επιθυμώ επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Ν. Γεωργίου, Α. Γκιώνη, Φ. Χατζηπιερή και Ε. Πέτσα για την επιστημονική τους βοήθεια κατά την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Ευχαριστίες αποδίδω και στη Νίκη Γουλένη, μεταπτυχιακή φοιτήτρια της Καθηγήτριας Σ. Βασιλείου που συνέθεσε το μόριο προς μελέτη.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δήμητρα Τζέλη για τη βοήθειά της στη διεκπεραίωση των θεωρητικών υπολογισμών.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή μου Θ. Μαυρομούστακο ο οποίος παρόλα τα οικογενειακά προβλήματά μου επέμενε και τελικά επιτεύχθηκε η διεκπεραίωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Γενικά.....	1
1.2 Χημική σύνθεση.....	2
1.3 Αντιφλεγμονώδης δράση .....	4
1.3.1 Αντι-οξεία παγκρεατίτιδα .....	5
1.3.2 Αντι-οξεία ηπατίτιδα .....	6
1.3.3 Αντι-κολίτιδα .....	6
1.3.4 Αντι-ρευματοειδής αρθρίτιδα .....	7
1.3.5 Αντι-περιοδοντίτιδα .....	8
1.4 Αντιβακτηριακή δράση .....	8
1.4.1 Αντι- <i>Staphylococcus aureus</i> .....	8
1.4.2 Αντι- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	9
1.4.3 Αντι-τροφογενές <i>Pseudomonas</i> .....	10
1.4.4 Αντιμυκητιασικό.....	10
1.4.5 Αντικαρκινική δράση.....	11
1.4.6 Καρκίνος του μαστού .....	11
1.4.7 Καρκίνος του παχέος εντέρου .....	12
1.4.8 Καρκίνος του πνεύμονα .....	13
1.4.9 Καρκίνος του προστάτη.....	13
1.4.10 Χρόνια μυελογενής λευχαιμία.....	14
1.5 Αντιδιαβητική δράση .....	15
1.6 Αντικαταθλιπτικό.....	15
1.7 Άλλες φαρμακολογικές επιδράσεις .....	16
1.8 Τοξικολογική αξιολόγηση.....	17
1.9 Τρέχουσα κατάσταση εφαρμογής και προοπτικές ανάπτυξης.....	20

1.10 Συμπεράσματα .....	21
1.11 Θεωρία στις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν .....	22
1.11.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού .....	22
1.11.2 Διαμορφωτική Ανάλυση .....	26
1.11.3 Μοριακή Πρόσδεση .....	28
1.11.4 Θεωρία συναρτησιακού πυκνότητας και Ημιεμπειρικοί υπολογισμοί .....	30
1.11.5 Μοριακή Δυναμική .....	31
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 Αντικειμενικοί Στόχοι της Μεταπτυχιακής Εργασίας .....</b>	<b>35</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Υλικά και Μέθοδοι .....</b>	<b>36</b>
3.1 Εισαγωγή .....	36
3.2 Σύνθεση του NGI25 .....	37
3.3 Διαμορφωτική ανάλυση .....	38
3.3.1 Φασματοσκοπία NMR .....	38
3.3.2 Σάρωση πλέγματος .....	38
3.3.3 Μοριακή δυναμική .....	38
3.3.4 Ημι-εμπειρικοί υπολογισμοί και υπολογισμοί IDFT .....	40
3.4 Επαγόμενη προσαρμογή .....	40
3.5 Μοριακή μηχανική/γενικευμένη επιφάνεια Born (MM/GBSA) .....	42
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 Αποτελέσματα και συζήτηση .....</b>	<b>43</b>
4.1 Σύνθεση του NGI-25 .....	43
4.2 Στρατηγική που εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό της δομής του NGI25 σε DMSO .....	43
4.3 Σάρωση πλέγματος .....	48
4.4 Ανάλυση διαμόρφωσης με χρήση μοριακής δυναμικής .....	49
4.5 Ανάλυση διαμόρφωσης με ημιεμπειρικές και QM μεθόδους .....	51
4.6 Μοριακή σύνδεση .....	51
4.6.1 LOX .....	52

4.6.2 BCHE .....	54
4.7 Μοριακή δυναμική των συμπλόκων «ενζύμου-προσδέτη» .....	56
4.7.1 LOX.....	57
4.7.2 BCHE .....	58
4.8 Υπολογισμοί MM/GBSA .....	59
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 Συμπεράσματα .....</b>	<b>61</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ .....</b>	<b>63</b>
<b>Συντμήσεις–Αρκτικόλεξα–Ακρωνύμια.....</b>	<b>65</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....</b>	<b>68</b>
<b>ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....</b>	<b>84</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Ιδιότητες παραγώγων κινναμικού οξέος.....	4
Σχήμα 1.2: Δομή του μορίου NGI25 που φέρει αρίθμηση στους άνθρακες του.....	22
Σχήμα 3.1: Παραδοσιακή αντίδραση Ugi-4CR. Για τη σύνθεση του NGI25 R1 = κυκλοεξυλο, R2 = H, R3 = παράγωγο κινναμικού, R4 = Bn .....	36
Σχήμα 4.1: Συνολικό διάγραμμα που δείχνει τη στρατηγική ταυτοποίησης της ένωσης NGI25 σε διαλύτες DMSO και CDCl <sub>3</sub> . Η ταυτοποίηση των κορυφών παρουσιάζεται στις εικόνες 4.1 και 4.2. ....	44
Σχήμα Π5: Δομή του μορίου NGI25 που φέρει αρίθμηση στους άνθρακες του όπως αυτοί χρησιμοποιήθηκαν κατά την ταυτοποίησή τους. ....	71

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Χημικές δομές του κινναμικού οξέος και των παραγώγων του. (Α) Κινναμικό οξύ; (Β) Μεθοξικινναμικό οξύ; (Γ) Υδροξικινναμικό οξύ; (Δ) φαινυλαιθέρας του καφεϊκού οξέος (CAPE).....	2
Εικόνα 1.2: Φάσμα $^{13}\text{C}$ του NGI25 σε $\text{CDCl}_3$ σε θερμοκρασία δωματίου. ....	23
Εικόνα 1.3: Φάσμα 2D COSY του NGI25 στη περιοχή 3,6-7,9 ppm σε $\text{CDCl}_3$ σε θερμοκρασία δωματίου. ....	24
Εικόνα 1.4: Φάσμα 2D COSY του NGI25 στη περιοχή 0-4 ppm $\text{CDCl}_3$ σε θερμοκρασία δωματίου.....	25
Εικόνα 1.5: Φάσμα $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ 2D HMBC του NGI25 στην περιοχή 4.2-7.8 ppm σε θερμοκρασία δωματίου. ....	26
Εικόνα 1.6: Οι ενέργειες του αιθανίου όταν περιστρέφεται κατά διάφορες δίεδρες γωνίες.....	27
Εικόνα 1.7: Μοριακή πρόσδεση. Ο προσδέτης καλύπτει μια συγκεκριμένη κοιλότητα του βιομορίου. ....	30
Εικόνα 1.8: Μεγάλες προσωπικότητες της κβαντομηχανικής.....	31
Εικόνα 1.9: Η Μοριακή Δυναμική έλαβε τεράστια ανάπτυξη. ....	33
Εικόνα 1.10: Υπολογισμός $\Delta G$ πρόσδεσης.....	33
Εικόνα 1.11: Θερμοδυναμικός κύκλος πρόσδεσης.....	34
Εικόνα 4.12: Φάσματα $^1\text{H}$ NMR: (άνω) Αλειφατική περιοχή του NGI25 (κάτω) αρωματική περιοχή. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε $\text{DMSO-d}_6$ .....	46
Εικόνα 4.13: Φάσματα $^1\text{H}$ NMR: (άνω) Πλήρης περιοχή (κάτω) αλειφατική περιοχή του NGI25. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε $\text{CDCl}_3$ .....	48
Εικόνα 4.14: Ενέργεια (kJ/mol) έναντι δίεδρης γωνίας (συντεταγμένη). ....	49
Εικόνα 4.15: Διαμόρφωση του NGI25 που προέρχεται από τις μεθοδολογίες (a) Grid scan (b) Molecular Dynamics (c) PM6 (d) DFT (B3LYP/6-311 + G(d,p)).. ....	50
Εικόνα 4.16: (a) Το ενεργό κέντρο του LOX. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ του NGI25 και των αμινοξέων του LOX σε (b) τρισδιάστατη δομή και (c) δισδιάστατη δομή. ....	52

Εικόνα 4.17: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ του zileuton και των αμινοξέων του LOX σε (a) τρισδιάστατη δομή και (b) δισδιάστατη δομή.....	53
Εικόνα 4.18: (a) Το ενεργό κέντρο της BCHE. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ του NGI25 και των αμινοξέων της BCHE σε (b) τρισδιάστατη δομή και (c) δισδιάστατη δομή .....	55
Εικόνα 4.19: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ριβαστιγμίνης και των αμινοξέων της BCHE σε (a) τρισδιάστατη δομή και (b) δισδιάστατη δομή.....	56
Εικόνα 4.20: Τιμές RMSD των πρωτεϊνών σε σύμπλοκα «ενζύμου-προσδέτη» για 200 ns της προσομοίωσης, λαμβάνοντας ως δομή αναφοράς τη στάση που προέκυψε από μελέτες πρόσδεσης. ....	57
Εικόνα 4.21: Τρισδιάστατες θέσεις (α) NGI25 και (β) zileuton στην κοιλότητα της LOX. Και οι δύο θέσεις προέρχονται από το κυρίαρχο σύμπλεγμα των αντίστοιχων προσομοιώσεων MD.....	57
Εικόνα 4.22: Τριδιάστατες θέσεις (a) NGI25 και (b) ριβαστιγμίνης στην κοιλότητα του BCHE. Και οι δύο θέσεις προέρχονται από το πιο κυρίαρχο σύμπλεγμα των αντίστοιχων προσομοιώσεων MD.....	59
Εικόνα Π23: Φάσματα <sup>1</sup> H NMR του NGI25. (άνω) Αλειφατική περιοχή του NGI25 (κάτω) αρωματική περιοχή. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε DMSO-d6 σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.....	72
Εικόνα Π24: Φάσματα 2D-COSY-NMR του NGI25. (άνω) Αλειφατική περιοχή του NGI25 (κάτω) αρωματική περιοχή. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε DMSO-d6 σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. ....	73
Εικόνα Π25: Φάσματα 2D-COSY-NMR του NGI25. (άνω) Αλειφατική περιοχή του NGI25 (κάτω) αρωματική περιοχή. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε DMSO-d6 σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. ....	74
Εικόνα Π26: Φάσματα <sup>13</sup> C-NMR του NGI25. (άνω) Αλειφατική περιοχή του NGI25 (κάτω) αρωματική περιοχή. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε DMSO-d6 σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. ....	75
Εικόνα Π27: Φάσματα 2D-HSQC-NMR Τα φάσματα καταγράφηκαν σε DMSO-d6 σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. ....	76
Εικόνα Π28: Φάσματα 2D-HMBC-NMR του NGI25. (άνω) Αλειφατική περιοχή του NGI25 (κάτω) αρωματική περιοχή. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε DMSO-d6 σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. ....	77

Εικόνα Π29: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του NGI25. (άνω) Πλήρες φάσμα ου NGI25. (κάτω) αλειφατική περιοχή Τα φάσματα καταγράφηκαν σε $\text{CDCl}_3$ σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. ....	78
Εικόνα Π30: Φάσμα 2D-COSY-NMR του NGI25. (άνω) Αρωματική περιοχή του NGI25. (κάτω) αλειφατική περιοχή Τα φάσματα καταγράφηκαν σε $\text{CDCl}_3$ σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.....	79
Εικόνα Π31: Φάσμα 2D-NOESY-NMR του NGI25. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε $\text{CDCl}_3$ σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. ....	80
Εικόνα Π32: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ του NGI25.. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε $\text{CDCl}_3$ σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. ....	80
Εικόνα Π33: Φάσμα 2D-HSQC-NMR του NGI25. (άνω) Πλήρες φάσμα ου NGI25. (κάτω) αρωματική περιοχή Τα φάσματα καταγράφηκαν σε $\text{CDCl}_3$ σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.....	81
Εικόνα Π34: Φάσμα 2D-HMBC-NMR του NGI25. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε $\text{CDCl}_3$ σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. ....	82

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 4.1: $\Delta G_{\text{δέσμευσης}}$ των συμπλόκων «ενζύμου-προσδέτη» όπως υπολογίστηκε μετά από μελέτες Μοριακής Δυναμικής.....	78
Πίνακας 2: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων .....	81
Πίνακας Π3: Αντιστοίχιση των κορυφών του φάσματος $^1\text{H}$ του NGI25 σε $\text{CDCl}_3$ (πάνω) και $\text{DMSO-d}_6$ (κάτω) .....	83
Πίνακας Π4: Αντιστοίχιση των κορυφών του φάσματος $^{13}\text{C}$ του NGI25 σε $\text{CDCl}_3$ (πάνω) και $\text{DMSO-d}_6$ (κάτω) .....	84
Πίνακας Π5: Οι δίεδρες γωνίες και οι αποστάσεις ανάμεσα στα πρωτόνια για τις τρεις μεθόδολογίες.....	85

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στα πλαίσια της μεταπτυχιακής μου εργασίας στο πρόγραμμα «Οργανική Σύνθεση και Εφαρμογές στη Βιομηχανία».

Το κύριο τμήμα της μεταπτυχιακής εργασίας εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Ανάλυσης που ανήκει στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας. Τμήμα της μεταπτυχιακής εργασίας εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσικοχημείας υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Δήμητρας Τζέλη.

Η σύνθεση του NGI125 διεκπερώθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Σύνθεσης του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Σταματίας Βασιλείου.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Γενικά

Η κανέλα είναι ο αποξηραμένος φλοιός του *Cinnamomum cassia* Presl (Camphoraceae) [1]. Η κανέλα χρησιμοποιείται εδώ και αιώνες τόσο ως φυτικό φάρμακο και ως μαγειρικό μπαχαρικό [2]. Στην παραδοσιακή ιατρική, η κανέλα είναι ένα σημαντικό φαρμακευτικό βότανο με ευρείες θεραπευτικές ιδιότητες [2]. Η σύγχρονη φαρμακολογική έρευνα έχει επιβεβαιώσει ότι τα κύρια δραστικά συστατικά της κανέλας, το κινναμικό οξύ και τα παράγωγά του, παρουσιάζουν πολλαπλές φαρμακολογικές επιδράσεις, συμπεριλαμβανομένων αντικαρκινικών, αντιφλεγμονωδών, αντιβακτηριακών, αντιδιαβητικών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων [3-7]. Αυτά τα ευρήματα όχι μόνο επικυρώνουν την ορθολογικότητα των παραδοσιακών εφαρμογών της, αλλά παρέχουν και επιστημονικές αποδείξεις για την επέκταση της σύγχρονης ιατρικής αξίας της.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι το κινναμικό οξύ και τα παράγωγά του εμφανίζουν θεραπευτικές επιδράσεις κατά διαφόρων τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού [8], του καρκίνου του παχέος εντέρου [9], του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα [10], του καρκίνου του προστάτη [11] και της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας [12]. Όσον αφορά τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές τους, το κινναμικό οξύ και τα παράγωγά του έχουν αποδειχθεί ότι αναστέλλουν την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών οδών του Toll-like receptor 4 (TLR4) και του πυρηνικού παράγοντα κB (NF-κB), οδηγώντας σε μειωμένη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως το TNF-α και η IL-6.

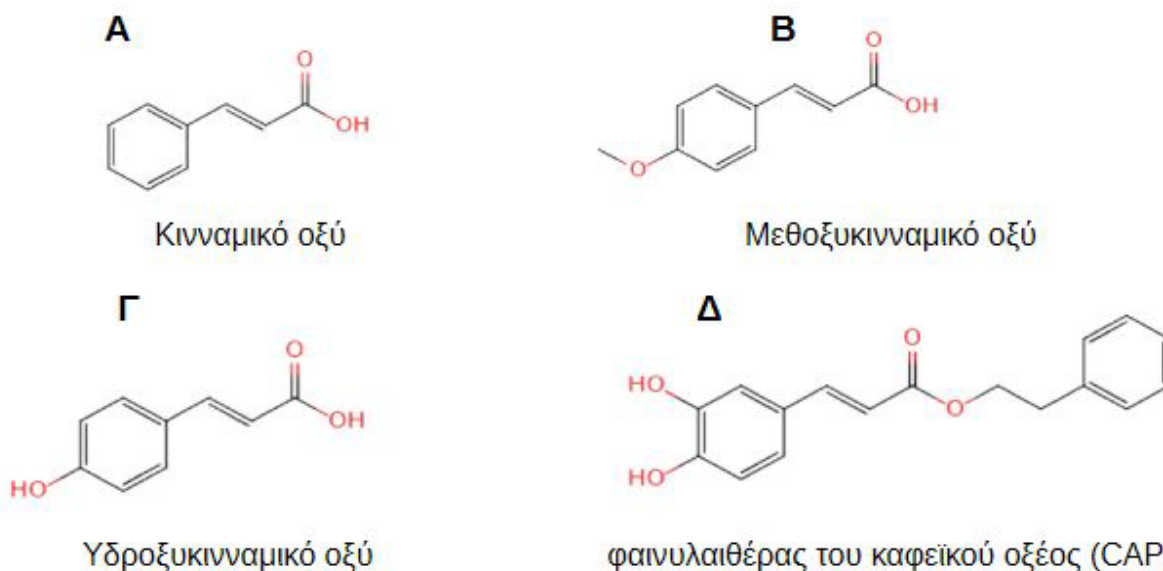
Έχει επισημανθεί ότι το κινναμικό οξύ και τα παράγωγά του παρουσιάζουν πολλαπλούς μηχανισμούς δράσης. Αυτές οι ενώσεις έχουν αποδείξει την ικανότητά τους να διεγείρουν την έκκριση ινσουλίνης, να βελτιώνουν τη λειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος, να αναστέλλουν την ηπατική γλυκονεογένεση και να ενισχύουν την πρόσληψη γλυκόζης.

Κατά συνέπεια, θεωρούνται πολλά υποσχόμενες ως πιθανή αποτελεσματική θεραπεία για τον διαβήτη [13]. Το κινναμικό οξύ και τα παράγωγά του παρουσιάζουν ποικίλα επίπεδα αντιβακτηριακής δράσης έναντι του *Staphylococcus aureus*, του *Pseudomonas aeruginosa*,

των τροφιμογενών ειδών *Pseudomonas*, του *Candida albicans* και άλλων στελεχών μυκήτων [14-17]. Στην παρούσα ανασκόπηση θα συγκεντρωθούμε στα βιβλιογραφικά δεδομένα της τελευταίας δεκαετίας

## 1.2 Χημική σύνθεση

Η κανέλα όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα κλινικών εφαρμογών. Το κινναμικό οξύ, ένα βασικό αρωματικό καρβοξυλικό οξύ της κανέλας, έχει μελετηθεί εκτενώς σε διεθνές επίπεδο. Με την πρόοδο των τεχνικών εκχύλισης των δραστικών συστατικών, έχει ανακαλυφθεί ότι το κινναμικό οξύ δεν βρίσκεται μόνο στην κανέλα, αλλά και σε διάφορα φρούτα, δημητριακά, λαχανικά, μέλι και άλλες φυσικές πηγές. Το κινναμικό οξύ (Εικόνα 1.1 Α) είναι ένα αρωματικό καρβοξυλικό οξύ που χαρακτηρίζεται από έναν βενζολικό δακτύλιο συζευγμένο με μια πλευρική αλυσίδα προπενικού οξέος. Χρησιμεύει ως βασικός σκελετός για πολλά παράγωγα, όπως το μεθοξυκινναμικό οξύ, το υδροξυκινναμικό οξύ και τον φαινυλεστέρα του καφεϊκού οξέος (CAPE), καθένα από τα οποία φέρει συγκεκριμένους υποκαταστάτες στον αρωματικό δακτύλιο ή τροποποιήσεις στην αλειφατική αλυσίδα (Εικόνα 1.1 Β–Δ).



Εικόνα 1.1: Χημικές δομές του κινναμικού οξέος και των παραγώγων του. (Α) Κινναμικό οξύ; (Β) Μεθοξυκινναμικό οξύ; (Γ) Υδροξυκινναμικό οξύ; (Δ) φαινυλαιθέρας του καφεϊκού οξέος (CAPE)

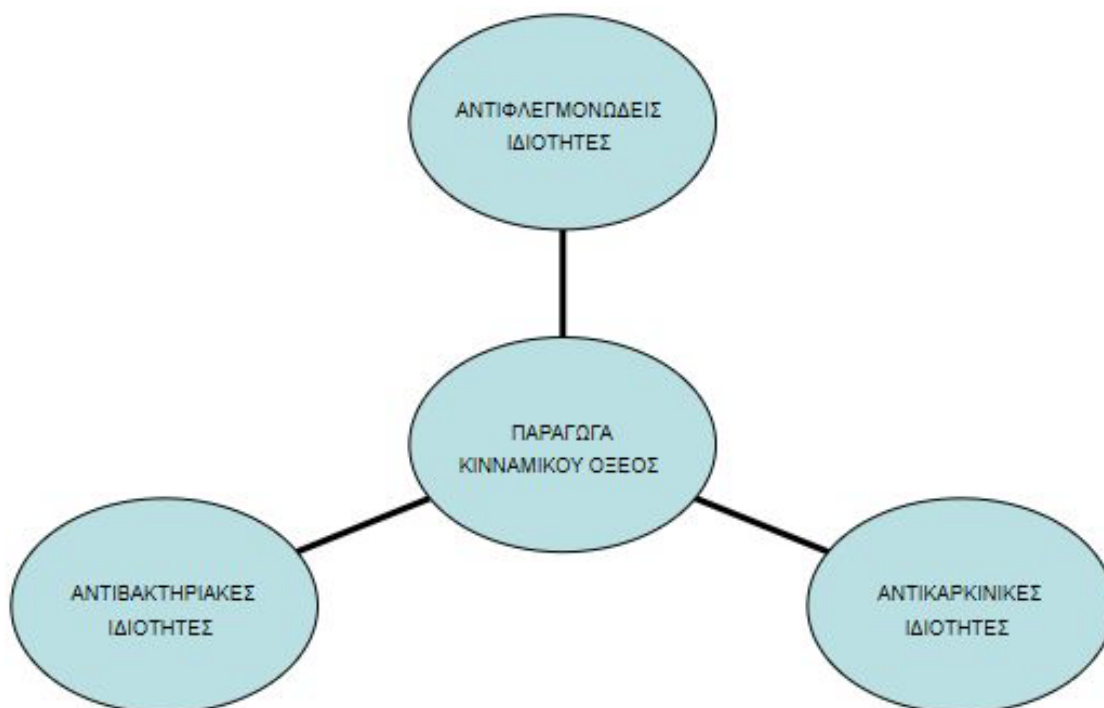
Εκτός από τη μητρική ένωση, το κινναμικό οξύ, έχουν ερευνηθεί εκτενώς διάφορα σημαντικά παράγωγα λόγω των πιθανών φαρμακολογικών τους ιδιοτήτων. Για παράδειγμα, το *trans*-κινναμικό οξύ (t-CA) διαφέρει από το *cis*-κινναμικό οξύ (c-CA) ως προς τη διαμόρφωση γύρω από τον διπλό δεσμό, ενώ ο φαινυλαιθέρας του καφεϊκού οξέος (CAPE) περιέχει επιπλέον υδροξυλομάδες στον αρωματικό δακτύλιο, ενισχύοντας τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες. Ο δεκυλεστέρας του 3,4,5-τριυδροξυκινναμικού οξέος εισάγει πολλαπλούς υδροξυλικούς υποκαταστάτες, οι οποίοι έχουν συσχετιστεί με αυξημένη προ-αποπτωτική δραστηριότητα σε ορισμένες καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Υποκαταστάτες όπως οι ομάδες μεθοξυ ( $-OCH_3$ ) και ή υδρόξυ ( $-OH$ ) μπορούν να αυξήσουν την πολικότητα και την ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, επηρεάζοντας ενδεχομένως τόσο τη βιοδιαθεσιμότητα όσο και τις αλληλεπιδράσεις με μοριακούς στόχους. Επίσης αυτές οι δομικές μεταβολές μπορεί να τροποποιήσουν και τους μοριακούς στόχους.

Μικρές δομικές αλλαγές όπως η υδροξυλίωση, η υποκατάσταση νιτρο ή η εστεροποίηση να κατευθύνουν καθοριστικά τη δέσμευση του στόχου, παρέχοντας έναν οδηγό για τη μελλοντική βελτιστοποίηση των δομικών ικριωμάτων κινναμικού οξέος.

Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ότι η εισαγωγή φαινολικών υδροξυλικών ομάδων ενισχύει τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δραστηριότητες αυξάνοντας την ικανότητα να αποδίδεται υδρογόνο [7]. Επιπλέον, ορισμένες τροποποιήσεις εστεροποίησης (π.χ. δεκυλικός εστέρας) μπορεί να βελτιώσουν τη λιποφιλικότητα, διευκολύνοντας έτσι την κυτταρική πρόσληψη [3]. Αυτές οι παραλλαγές στη χημική δομή αποτελούν τη βάση για τις ποικίλες βιοδραστικότητες που καλύπτονται στις επόμενες ενότητες.

Δεδομένου του πολλά υποσχόμενου ερευνητικού δυναμικού του, το κινναμικό οξύ μπορεί να συντεθεί μέσω της αποαμίνωσης της φαινυλαλανίνης για να καλύψει τις κλινικές ανάγκες [18]. Το κινναμικό οξύ χρησιμεύει ως βασικό ικρίωμα για διάφορα παράγωγα, καθένα από τα οποία παρουσιάζει μοναδικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που μπορούν να επηρεάσουν τις θεραπευτικές τους εφαρμογές. Πέρα από την παρουσία του στο φλοιό της κανέλας, το κινναμικό οξύ χρησιμοποιείται σε πολλές βιομηχανίες, συμπεριλαμβανομένων των φαρμάκων, των τροφίμων και των καλλυντικών. Λειτουργεί επίσης ως συστατικό αρώματος σε απορρυπαντικά και προϊόντα προσωπικής φροντίδας [19].



**Σχήμα 1.1:** Ιδιότητες παραγώγων κινναμικού οξέος

Συμπερασματικά, η δομική ποικιλομορφία των παραγώγων του κινναμικού οξέος υποστηρίζει τις ποικίλες βιοδραστικότητές τους. Οι ακόλουθες ενότητες διερευνούν πώς αυτές οι δομικές τροποποιήσεις συσχετίζονται με τους αντιφλεγμονώδεις, αντιβακτηριακούς και αντικαρκινικούς μηχανισμούς, απεικονίζοντας το δυναμικό για στοχευμένη θεραπευτική εφαρμογή.

### **1.3 Αντιφλεγμονώδης δράση**

Η φλεγμονή είναι η ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού σε παθογόνα, τοξικές ουσίες και περιβαλλοντικούς παράγοντες στρες [20]. Εάν δεν αντιμετωπιστεί, η φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει σε χρόνιες παθολογικές καταστάσεις που διαιωνίζουν την ενεργοποίηση των ανοσοκυττάρων και τη βλάβη των ιστών [21]. Επομένως, η αναζήτηση νέων αντιφλεγμονωδών θεραπευτικών επιλογών είναι ζωτικής σημασίας. Το κινναμικό οξύ,

μια φυσική ένωση, έχει προσελκύσει σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον για τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές του. Η διερεύνηση του κινναμικού οξέος και των παραγώγων του ως πιθανών αντιφλεγμονωδών παραγόντων είναι επομένως πολύ σημαντική.

### **1.3.1 Αντι-οξεία παγκρεατίτιδα**

Η οξεία παγκρεατίτιδα είναι μια φλεγμονή που προκαλείται από την ανώμαλη ενεργοποίηση των παγκρεατικών πεπτικών ενζύμων [22].

Λόγω της πολύπλοκης αιτιολογίας, των πολυάριθμων επιπλοκών και του υψηλού ποσοστού θνησιμότητας, η οξεία παγκρεατίτιδα οδηγεί σε μέτρια έως σοβαρή νόσο σε περίπου 20% των ασθενών. Αυτά τα συμπτώματα εκδηλώνονται συνήθως ως οξύς κοιλιακός πόνος, φούσκωμα, ναυτία, έμετος και πυρετός [23]. Έρευνες έχουν δείξει ότι η ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει παγκρεατίτιδα. Για παράδειγμα, η ακτινοθεραπεία της κοιλιακής χώρας μπορεί να προκαλέσει νέκρωση των κυττάρων των αδενοκυττάρων, ήπια βλάβη των κυττάρων των πόρων, ατροφία των πόρων, αγγειοπάθεια και διάχυτη καθυστερημένη ίνωση στο πάγκρεας [24]. Ως εκ τούτου, η έκθεση στην ακτινοβολία αναγνωρίζεται πλέον ως σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την παγκρεατίτιδα.

Η μελέτη της Omayma AR Abozaid [25] ανακάλυψε ότι τα νανοσωματίδια κινναμικού οξέος (CA-NPs) παρουσιάζουν θεραπευτική επίδραση σε αρουραίους που πάσχουν από οξεία παγκρεατίτιδα που προκαλείται από L-αργινίνη και ακτίνες-γ.

Γενικά, τα CA-NPs ανακουφίζουν τη σοβαρότητα της οξείας παγκρεατίτιδας μέσω της υπορύθμισης του γονιδίου NLRP3 και μετριάζουν το οξειδωτικό στρες και τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις αναστέλλοντας τις οδούς σηματοδότησης NF-κB και ASK1/MAPK. Με βάση αυτόν τον μηχανισμό, τα CA-NPs παρουσιάζουν δυναμικό ως θεραπευτικό παράγοντα για την οξεία παγκρεατίτιδα. Ωστόσο, οι εγγενείς φυσιολογικές και μεταβολικές διαφορές μεταξύ των ζωικών μοντέλων και των ανθρώπων απαιτούν περαιτέρω επικύρωση του δυναμικού και της ασφάλειάς τους σε μοντέλα και κλινικές δοκιμές που σχετίζονται περισσότερο με τον άνθρωπο.

### **1.3.2 Αντι-οξεία ηπατίτιδα**

Η ηπατίτιδα είναι ένα παγκόσμιο πρόβλημα δημόσιας υγείας που προκαλείται από αυτοάνοσες ασθένειες, κατανάλωση αλκοόλ, μεταβολικές διαταραχές, ιογενείς λοιμώξεις και λιπώδη ηπατοπάθεια [26]. Η οξεία ηπατίτιδα χαρακτηρίζεται από σοβαρή φλεγμονή, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε νέκρωση των ηπατικών κυττάρων και τελικά σε ηπατική ανεπάρκεια, αποτελώντας σοβαρή απειλή για την υγεία και την επιβίωση του ανθρώπου [27].

Γενικά, τα CA-NPs εμφανίζουν σημαντικές ηπατοπροστατευτικές επιδράσεις στο μοντέλο αρουραίων με οξεία ηπατίτιδα που προκαλείται από D-Gal και ακτινοβολία, αναστέλλοντας την οδό MyD88/TLR4, παρέχοντας πειραματικές ενδείξεις για την κλινική τους εφαρμογή στη θεραπεία της οξείας ηπατίτιδας. Ωστόσο, λόγω των εγγενών φυσιολογικών και μεταβολικών διαφορών μεταξύ των μοντέλων τρωκτικών και των ανθρώπων όσον αφορά την αιτιολογία, την εξέλιξη της νόσου και την ανταπόκριση στα φάρμακα, η άμεση μεταφορά αυτών των ευρημάτων στην κλινική πρακτική απαιτεί προσοχή. Απαιτούνται μελλοντικές συστηματικές κλινικές δοκιμές για την περαιτέρω επικύρωση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας των CA-NPs.

### **1.3.3 Αντι-κολίτιδα**

Η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (IBD) είναι μια χρόνια και υποτροπιάζουσα φλεγμονώδης νόσος του γαστρεντερικού σωλήνα, που περιλαμβάνει την ελκώδη κολίτιδα (UC) και τη νόσο του Crohn [28]. Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν φάρμακα για τη θεραπεία της IBD, και τα υπάρχοντα φάρμακα κατά της IBD, όπως τα αμινοσαλικυλικά, τα γλυκοκορτικοειδή και τα ανοσοκατασταλτικά, μπορούν μόνο να ανακουφίσουν τα συμπτώματα [29]. Για την επίλυση των προβλημάτων της χαμηλής αποτελεσματικότητας και των σοβαρών παρενεργειών που προκαλούνται από τη μακροχρόνια χρήση [30], έχουν σημειωθεί πρόσφατα πρόοδοι στη θεραπεία της IBD με την εισαγωγή βιολογικών παραγόντων κατά του παράγοντα νέκρωσης όγκων, κατά της ιντεγκρίνης και κατά της IL-12 και IL-23 [31]. Οι βιολογικοί παράγοντες, αν και είναι αποτελεσματικοί, παρουσιάζουν μειονεκτήματα όπως συχνές παρενέργειες, υψηλό κόστος φαρμάκων, μη παρεντερικές μεθόδους χορήγησης, που οδηγούν σε μη συμμόρφωση των ασθενών και πιθανή ανάπτυξη αυξημένης ανοχής στους ασθενείς [32]. Για να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητα και να μειωθεί η τοξικότητα των συμβατικών φαρμάκων, είναι

απαραίτητο να διερευνηθούν διεξοδικά και να αναπτυχθούν φάρμακα μικρών μορίων για την αντιμετώπιση της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου (IBD). Κατά τη διάρκεια της έρευνας για πιθανά φυσικά προϊόντα για τη θεραπεία της κολίτιδας, το κινναμικό οξύ (CA) αναγνωρίστηκε ως ένα πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό παράγοντα.

Γενικά, το κινναμικό οξύ και τα παράγωγά του είναι πολλά υποσχόμενα φάρμακα για τη θεραπεία της κολίτιδας, και τα αποτελέσματα αυτά προσφέρουν νέες πληροφορίες σχετικά με τις λειτουργίες του κινναμικού οξέος και των παραγώγων του στη θεραπεία της κολίτιδας.

#### **1.3.4 Αντι-ρευματοειδής αρθρίτιδα**

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα (RA) είναι μια ανθεκτική και πολύ συχνή αυτοάνοση ασθένεια [33]. Τα κύρια παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου περιλαμβάνουν χρόνια επίμονη αρθρίτιδα, υπερπλασία των αρθρικών κυττάρων (FLS), φλεγμονώδη κυτταρική διήθηση (συμπεριλαμβανομένων μονοκυττάρων, πολυκλωνικών Β κυττάρων και Τ κυττάρων), διάβρωση και καταστροφή του οστικού ιστού [34]. Αυτοί οι παράγοντες συμβάλλουν στη δομική βλάβη των αρθρώσεων, στις παραμορφώσεις και στην τελική απώλεια της λειτουργίας τους [35]. Επί του παρόντος, οι κύριες θεραπείες για τη RA συνίστανται σε χειρουργική επέμβαση και φαρμακευτική αγωγή [36], συμπεριλαμβανομένων των φαρμάκων κατά της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (DMARD), των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (NSAID), των γλυκοκορτικοειδών και των τροποποιητών της βιολογικής απόκρισης. Αν και αυτά τα φάρμακα έχουν τη δυνατότητα να μειώσουν την αρθρίτιδα και τη συστηματική φλεγμονή, ενδέχεται να είναι λιγότερο αποτελεσματικά για ορισμένους ασθενείς [37]. Ως εκ τούτου, είναι ζωτικής σημασίας η απόκτηση μιας ολοκληρωμένης κατανόησης της παθογένειας της RA, ο προσδιορισμός νέων θεραπευτικών στόχων και η ανάπτυξη καινοτόμων θεραπευτικών φαρμάκων.

Γενικά, ο συνδυασμός CA και MG αναστέλλει αποτελεσματικά την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη σηματοδοτική οδό TLR4/PI3K/AKT/NF-κB, μειώνει την έκφραση της κασπάσης-1 και μειώνει την απελευθέρωση IL-1β, με αποτέλεσμα την ανακούφιση των συμπτωμάτων της αρθρίτιδας και της οστικής διάβρωσης. Το εύρημα αυτό προσφέρει μια νέα οδό για περαιτέρω λεπτομερή διερεύνηση του μηχανισμού του κινναμικού οξέος στη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας.

### **1.3.5 Αντι-περιοδοντίτιδα**

Η περιοδοντίτιδα είναι μια χρόνια και καταστροφική ασθένεια που προσβάλλει τους περιοδοντικούς ιστούς [38]. Η ανάπτυξή της συνδέεται με μια ανισορροπία στο στοματικό μικροβίωμα και την φλεγμονώδη απόκριση του ξενιστή [39]. Το επίπεδο συσσώρευσης μικροβιακής πλάκας συνδέεται άμεσα με την έκταση της φλεγμονής, η οποία με τη σειρά της καθορίζει τη σοβαρότητα της νόσου [40]. Αντιμετωπίζοντας τη φλεγμονώδη κατάσταση, είναι δυνατό να σταματήσει η πρόοδος της περιοδοντικής καταστροφής και να βελτιωθεί η περιοδοντική υγεία. Επομένως, η ανάπτυξη νέων φαρμάκων για τη θεραπεία της περιοδοντίτιδας παρουσιάζει σημαντική σημασία.

Γενικά, η από του στόματος χορήγηση κινναμικού οξέος έδειξε να έχει σημαντική προληπτική επίδραση στην περιοδοντίτιδα και επίσης βοήθησε στην καταστολή της φλεγμονώδους αντίδρασης του ξενιστή. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το κινναμικό οξύ θα μπορούσε ενδεχομένως να αποτελέσει μια αποτελεσματική συμπληρωματική θεραπεία ή προληπτικό φάρμακο για την περιοδοντίτιδα.

### **1.4 Αντιβακτηριακή δράση**

Το κινναμικό οξύ, ένα συστατικό της κανέλας, έχει αποδείξει την ικανότητά του να αναστέλλει την ανάπτυξη διαφόρων βακτηρίων και μυκήτων, καθιστώντας το ένα πολύτιμο φυσικό αντιβακτηριακό και αντισηπτικό παράγοντα [41,42]. Επομένως, η κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους το κινναμικό οξύ και τα παράγωγά του καταπολεμούν τα παθογόνα μικρόβια είναι ζωτικής σημασίας για την προστασία της ανθρώπινης υγείας.

#### **1.4.1 Αντι-*Staphylococcus aureus***

Ο *Staphylococcus aureus* είναι ένα από τα κοινά ευκαιριακά βακτηριακά παθογόνα που αποικίζουν τον άνθρωπο και προκαλεί σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα σε όλο τον κόσμο [43]. Ορισμένα στελέχη μπορούν να παράγουν σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες [44]. Στην Κίνα, το ένα τέταρτο των περιπτώσεων βακτηριακής τροφικής δηλητηρίασης προκαλείται από τον *Staphylococcus aureus*. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει μια αυξανόμενη αντοχή στα αντιβιοτικά στον *Staphylococcus aureus* [45], οδηγώντας στην εμφάνιση πολυανθεκτικών στελεχών (MRSA). Κατά συνέπεια, η αναζήτηση νέων

αντιβακτηριακών παραγόντων έχει καταστεί κορυφαία προτεραιότητα. Το κινναμικό οξύ, ένα φυσικό φυτικό εκχύλισμα, είναι γνωστό για τη σημαντική αντιβακτηριακή του δράση, ιδιαίτερα για την ανασταλτική του επίδραση στον *Staphylococcus aureus*.

Γενικά, το κινναμικό οξύ εμφανίζει ισχυρή δράση κατά του *Staphylococcus aureus*, συμπεριλαμβανομένων των ανθεκτικών στα φάρμακα στελεχών, μέσω μηχανισμών όπως η βλάβη της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης και η αναστολή του βιοφίλμ. Ως αποτέλεσμα, το κινναμικό οξύ εμφανίζεται πολλά υποσχόμενο ως θεραπευτικό μέσο για την καταπολέμηση των λοιμώξεων από *S. aureus*.

#### **1.4.2 Αντι-*Pseudomonas aeruginosa***

Ο *Pseudomonas aeruginosa* (PA) είναι ένας αερόβιος βακίλος που χαρακτηρίζεται από κινητικότητα και μονοπολικό μαστίγιο [46]. Είναι επίσης ένα Gram-αρνητικό παθογόνο [47], υπεύθυνο για την πρόκληση μιας ποικιλίας συστηματικών ασθενειών, που επηρεάζουν ιδιαίτερα το πεπτικό και το αναπνευστικό σύστημα. Η υπερβολική χρήση αντιβιοτικών έχει οδηγήσει στην εμφάνιση πολυανθεκτικών ή ακόμη και πανανθεκτικών *Pseudomonas aeruginosa*, παρουσιάζοντας σημαντικές προκλήσεις για την κλινική θεραπεία [48]. Σε ασθενείς με εγκαύματα, οι λοιμώξεις των πληγών αποτελούν σημαντικό κίνδυνο [49]. Οι πληγές από εγκαύματα συχνά μολύνονται με ανθεκτικά στα αντιβιοτικά στελέχη *Pseudomonas aeruginosa*, επιδεινώνοντας την κατάσταση της πληγής και περιπλέκοντας τη θεραπεία [50]. Η υπερβολική χρήση αντιβιοτικών έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη βιομεμβρανών από τον *Pseudomonas aeruginosa*, περιπλέκοντας περαιτέρω την αποτελεσματική θεραπεία [51]. Τα αντιμικροβιακά καρβαπενέμης χρησιμοποιούνται συνήθως ως έσχατη λύση για τη θεραπεία λοιμώξεων από *Pseudomonas aeruginosa*. Ωστόσο, παρατηρείται μια αυξανόμενη τάση αντοχής στα φάρμακα αυτά στα στελέχη PA. Με τη μείωση της αποτελεσματικότητας των παραδοσιακών αντιβακτηριακών θεραπειών, υπάρχει επείγουσα ανάγκη για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος, οι επιστήμονες ερευνούν τη χρήση φυσικών προϊόντων στην περιποίηση τραυμάτων, προκειμένου να μετριαστούν οι αρνητικές επιπτώσεις των αντιβακτηριακών φαρμάκων και να προσφερθούν νέες εναλλακτικές θεραπείες.

Γενικά, το κινναμικό οξύ και τα παράγωγά του επιδεικνύουν ανασταλτική επίδραση στον *Pseudomonas aeruginosa*, επηρεάζοντας την παραγωγή παραγόντων παθογένειας που σχετίζονται με τη διαταραχή του συστήματος ανίχνευσης του βακτηριακού quorum και του σχηματισμού βιοφίλμ. Αυτά τα αποτελέσματα παρέχουν μια ισχυρή βάση για μελλοντικές έρευνες σχετικά με τη δυνητική χρήση του κινναμικού οξέος ως εναλλακτικής λύσης των συμβατικών αντιβακτηριακών παραγόντων.

#### **1.4.3 Αντι-τροφογενές *Pseudomonas***

Το ψυχρόφιλο *Pseudomonas* που μεταδίδεται μέσω των τροφίμων είναι ένα Gram-αρνητικό, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο που αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες μεταξύ 2 °C και 35 °C [52], προκαλώντας αλλοίωση των τροφίμων [53] και σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις στη βιομηχανία τροφίμων [54]. Αυτά τα βακτήρια συμβάλλουν στη μείωση της ποιότητας των τροφίμων μέσω της δραστηριότητας των εξωκυτταρικών πρωτεασών και λιπασών σε προϊόντα όπως το γάλα, το κρέας και τα θαλασσινά εντός της ψυκτικής αλυσίδας [55]. Κατά συνέπεια, είναι ζωτικής σημασίας η εφαρμογή αποτελεσματικών προληπτικών στρατηγικών για τον μετριασμό των οικονομικών απωλειών στα τρόφιμα της ψυκτικής αλυσίδας. Λόγω των περιορισμών της παραδοσιακής θερμικής επεξεργασίας σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας, οι φυτικές πολυφαινόλες, ως φυσικά προϊόντα, έχουν καταστεί αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα τρόφιμα [56]

Γενικά, το κινναμικό οξύ επιδεικνύει αξιοσημείωτη αντιβακτηριακή δράση κατά των τροφιμογενών *Pseudomonas*. Ο κύριος αντιβακτηριακός μηχανισμός του περιλαμβάνει την υπονόμηση της ακεραιότητας της κυτταρικής δομής, οδηγώντας σε διαταραχή της ομοιόστασης της κυτταρικής μεμβράνης. Επιπλέον, διαταράσσει τον ενδοκυτταρικό μεταβολισμό ενέργειας των βακτηρίων. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι το κινναμικό οξύ είναι πολλά υποσχόμενο ως πιθανό φάρμακο κατά των τροφιμογενών ειδών *Pseudomonas*.

#### **1.4.4 Αντιμυκητιασικό**

Οι μυκητιασικές λοιμώξεις αποτελούν σημαντική πρόκληση για τη δημόσια υγεία παγκοσμίως, ιδίως με την εμφάνιση ανθεκτικών στα φάρμακα στελεχών όπως το *Candida* και το *Aspergillus fumigatus*, τα οποία έχουν οδηγήσει σε μείωση της αποτελεσματικότητας των παραδοσιακών αντιμυκητιασικών φαρμάκων [57,58]. Τα φυσικά προϊόντα και τα παράγωγά

τους γίνονται σταδιακά μια σημαντική κατεύθυνση στην ανάπτυξη αντιμυκητιασικών φαρμάκων λόγω της μοναδικής δομικής τους ποικιλομορφίας και των χαμηλότερων χαρακτηριστικών τοξικότητας. Μεταξύ αυτών, τα παράγωγα του κινναμικού οξέος έχουν συγκεντρώσει σημαντική προσοχή στον τομέα της ανάπτυξης αντιμυκητιασικών φαρμάκων λόγω των εξαιρετικών ανασταλτικών τους αποτελεσμάτων έναντι των ανθεκτικών στα φάρμακα στελεχών.

Γενικά, τα παράγωγα του κινναμικού οξέος εμφανίζουν ορισμένες αντιμυκητιασικές ιδιότητες έναντι ανθεκτικών στα φάρμακα στελεχών, παρέχοντας μια θεωρητική βάση για την ανάπτυξη νέων αντιμυκητιασικών φαρμάκων στο μέλλον.

#### **1.4.5 Αντικαρκινική δράση**

Ο καρκίνος, μια από τις κύριες αιτίες θνησιμότητας παγκοσμίως, εμφανίζεται όταν ο καρκινικός ιστός διεισδύει επιθετικά στον παρακείμενο υγιή ιστό και δημιουργεί δευτερογενείς όγκους (μεταστάσεις) σε διάφορα όργανα [59]. Τα ποσοστά εμφάνισης και θνησιμότητας των κακοήθων όγκων αυξάνονται, αποτελώντας σημαντική απειλή για την ανθρώπινη υγεία και ένα κρίσιμο ζήτημα δημόσιας υγείας που απαιτεί παγκόσμια προσοχή. Επί του παρόντος, η κύρια μέθοδος στην αντικαρκινική θεραπεία περιστρέφεται γύρω από τη χρήση φαρμάκων μικρών μορίων. Αυτές οι θεραπείες έχουν επιτύχει αξιοσημείωτη επιτυχία και έχουν διαδραματίσει ζωτικό ρόλο στην παράταση της ζωής των ατόμων με καρκίνο [60]. Ωστόσο, στην κλινική πρακτική, τα αντικαρκινικά φάρμακα αντιμετωπίζουν συνήθως προβλήματα αντοχής [61], καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη να διερευνηθούν και να δημιουργηθούν εναλλακτικά φάρμακα με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και λιγότερες παρενέργειες για την αποτελεσματική αναστολή της εξέλιξης του καρκίνου.

#### **1.4.6 Καρκίνος του μαστού**

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο κοινός κακοήθης όγκος και η κύρια αιτία θνησιμότητας από καρκίνο στις γυναίκες [62]. Τα τελευταία στοιχεία δείχνουν ότι οι νέες διαγνώσεις καρκίνου του μαστού παγκοσμίως έχουν φτάσει τα 2,26 εκατομμύρια, ξεπερνώντας τον καρκίνο του πνεύμονα και καθιστώντας τον τον πιο κοινό τύπο καρκίνου [63]. Η πρόγνωση του καρκίνου του μαστού είναι πιο ευνοϊκή στα αρχικά στάδια, ωστόσο, οι προκλήσεις παραμένουν στα μεσαία και τελικά στάδια [64]. Αν και η θεραπεία έχει δείξει υποσχόμενα αποτελέσματα στην

αύξηση των ποσοστών επιβίωσης των ασθενών, προκαλεί επίσης σημαντική ψυχολογική και σωματική καταπόνηση. Μελέτες έχουν δείξει πιθανές ανασταλτικές ιδιότητες των παραγώγων του κινναμικού οξέος στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού, ωστόσο απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την πλήρη κατανόηση των υποκείμενων μηχανισμών και στόχων.

Τα παράγωγα του κινναμικού οξέος έχουν δείξει μεγάλο δυναμικό στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες για τη θεραπεία και την ανάπτυξη φαρμάκων. Περαιτέρω έρευνα και εξερεύνηση αυτών των παραγώγων αναμένεται να αποκαλύψει πιο αποτελεσματικές θεραπείες, προσφέροντας τελικά μεγαλύτερη ελπίδα και δυνατότητες για τους ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

#### **1.4.7 Καρκίνος του παχέος εντέρου**

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (CRC) είναι ένας κοινός τύπος καρκίνου που επηρεάζει το γαστρεντερικό σωλήνα. Είναι η δεύτερη υψηλότερη αιτία θανάτων που σχετίζονται με τον καρκίνο παγκοσμίως και κατατάσσεται ως ο τρίτος πιο συχνά διαγιγνώσκόμενος κακοήθης όγκος [63]. Τα πρώιμα συμπτώματα δεν είναι εμφανή [65] και το ποσοστό εμφάνισής του είναι δεύτερο μετά τον καρκίνο του πνεύμονα και τον καρκίνο του στομάχου στην Κίνα [66]. Πρόσθετες θεραπείες όπως η χειρουργική επέμβαση, η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία μπορούν να βελτιώσουν τα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου (CRC), οδηγώντας σε ποσοστό επιβίωσης 65% μετά από 5 χρόνια, το ποσοστό επιβίωσης 5 ετών για τον προχωρημένο CRC μειώνεται σημαντικά σε μόλις 15% [67]. Η πλήρης χειρουργική αφαίρεση του όγκου και των μεταστατικών του εστιών βελτιώνει τη συνολική επιβίωση (OS) των ασθενών με CRC. Ωστόσο, περίπου το 25% των περιπτώσεων CRC διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο με απομακρυσμένες μεταστάσεις, γεγονός που περιπλέκει τη χειρουργική επέμβαση. Επομένως, υπάρχει επείγουσα ανάγκη για την ανάπτυξη νέων θεραπειών για τον CRC.

Γενικά, η έρευνα αποδεικνύει ότι το *trans*-κινναμικό οξύ (t-CA) ασκεί ανασταλτική δράση στους όγκους του παχέος εντέρου που μεταμοσχεύθηκαν σε ποντίκια. Αυτή η αντικαρκινική δράση του t-CA πιθανώς μεσολαβείται μέσω της αναστολής της ιστόνης δεακετυλάσης (HDAC) στα καρκινικά κύτταρα. Αυτά τα ευρήματα προσφέρουν μια θεωρητική βάση και πρακτική σημασία για τη μελλοντική ανάπτυξη νέων θεραπευτικών φαρμάκων.

#### **1.4.8 Καρκίνος του πνεύμονα**

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι μια πολύπλοκη και ποικίλη ασθένεια. Η απουσία αξιόπιστων τεχνικών διαγνωστικού ελέγχου συχνά έχει ως αποτέλεσμα οι ασθενείς να διαγιγνώσκονται σε μεταγενέστερα στάδια, γεγονός που δημιουργεί προκλήσεις για τη θεραπεία [68]. Κατά συνέπεια, η επικράτηση του καρκίνου του πνεύμονα έχει αυξηθεί, καθιστώντας τον την κύρια αιτία θνησιμότητας από καρκίνο, με προβλέψεις που δείχνουν περαιτέρω αύξηση στο μέλλον [69]. Μέσα στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC), ο LUAD είναι ο πιο κοινός υποτύπος. Ενώ οι ασθενείς με LUAD σε πρώιμο στάδιο παρουσιάζουν καλύτερη πρόγνωση, ένα σημαντικό ποσοστό, που κυμαίνεται από 10% έως 44%, εξακολουθεί να μην επιβιώνει πέραν της περιόδου των 5 ετών μετά τη χειρουργική θεραπεία [70,71]. Επί του παρόντος, οι θεραπευτικές μέθοδοι για τον LUAD περιλαμβάνουν χειρουργική εκτομή, ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία και ανοσοθεραπεία, μαζί με ολοκληρωμένες προσεγγίσεις που συνδυάζουν κινεζικές και δυτικές ιατρικές πρακτικές. Ωστόσο, ο συχνά χρησιμοποιούμενος αντικαρκινικός παράγοντας σισπλατίνη είναι ιδιαίτερα εξαρτώμενος από τη δόση. Αυτό το φάρμακο μεταβολίζεται κυρίως στο ήπαρ και εκκρίνεται μέσω των νεφρών [72], καθιστώντας το επιρρεπές σε παρενέργειες, όπως ηπατοτοξικότητα και νεφροτοξικότητα [73].

Γενικά, τόσο το c-CA όσο και το t-CA έχουν δείξει δυνατότητες στην αναστολή της εισβολής των κυττάρων A549, μειώνοντας αποτελεσματικά τη μετανάστευση των κυττάρων και τις δραστηριότητες των MMP-2 και MMP-9, οδηγώντας τελικά στην αναστολή της πολλαπλασιασμού του όγκου. Αυτό υποδηλώνει ότι το κινναμικό οξύ θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί ως φάρμακο για τον μετριασμό της εισβολής του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα, προσφέροντας μια σταθερή θεωρητική βάση και πρακτική σημασία για τη συνέχιση της έρευνας σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς του και την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών προϊόντων.

#### **1.4.9 Καρκίνος του προστάτη**

Σε παγκόσμιο επίπεδο, ο καρκίνος του προστάτη κατατάσσεται ως ο δεύτερος πιο διαδεδομένος καρκίνος στους άνδρες, ευθύνεται για σχεδόν 400.000 θανάτους ετησίως και αποτελεί περίπου το 4% όλων των θανάτων από καρκίνο στους άνδρες [74]. Ο καρκίνος του

προστάτη συνδέεται συνήθως με την ηλικία, επηρεάζοντας ιδιαίτερα τους άνδρες ηλικίας 65 ετών και άνω. Άλλοι παράγοντες, όπως οι διατροφικές συνήθειες, η παχυσαρκία, η γενετική προδιάθεση και το ιστορικό σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων, μπορεί επίσης να συμβάλλουν στην εμφάνιση καρκίνου του προστάτη [75]. Τα αρχικά στάδια του καρκίνου του προστάτη είναι συνήθως ασυμπτωματικά, γεγονός που περιπλέκει την έγκαιρη διάγνωση. Καθώς η νόσος εξελίσσεται, οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν συμπτώματα όπως συχνή ούρηση, δυσκολία στην ούρηση, αυξημένη νυχτερινή ούρηση και πόνος στην πλάτη. Οι συνήθειες θεραπείες για τον καρκίνο του προστάτη περιλαμβάνουν χειρουργική επέμβαση, ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία και θεραπεία στέρσης ανδρογόνων, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε ανεπιθύμητες ενέργειες. Για παράδειγμα, η θεραπεία στέρσης ανδρογόνων μπορεί να προκαλέσει προβλήματα όπως στυτική δυσλειτουργία, εξάψεις, αναιμία και κατάθλιψη [76]. Ως εκ τούτου, υπάρχει επείγουσα ανάγκη να διερευνηθούν και να αναπτυχθούν νέα φάρμακα για την πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη.

Γενικά, η σε βάθος έρευνα σχετικά με τον μηχανισμό των παραγώγων του κινναμικού οξέος που προκαλούν απόπτωση στα κύτταρα του καρκίνου του προστάτη όχι μόνο προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες και προοπτικές για την εξερεύνηση νέων στρατηγικών θεραπείας του καρκίνου του προστάτη, αλλά και παρέχει καθοδήγηση για τη μελλοντική χρήση των παραγώγων του κινναμικού οξέος στη θεραπεία του.

#### **1.4.10 Χρόνια μυελογενής λευχαιμία**

Η χρόνια μυελογενής λευχαιμία (CML) είναι ένα μυελοπολλαπλασιαστικό νεόπλασμα που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτη πολλαπλασιασμό ώριμων μυελοειδών κυττάρων [77]. Η παγκόσμια συχνότητα εμφάνισης της λευχαιμίας σε ενήλικες είναι περίπου 15% [78]. Παρά το γεγονός ότι τα άτομα με CML που υποβάλλονται σε θεραπεία με αναστολείς τυροσίνης κινάσης (TKIs) παρουσιάζουν προσδόκιμο ζωής παρόμοιο με τον γενικό πληθυσμό, η διαχείριση της νόσου αντιμετωπίζει προβλήματα όπως η αντοχή στα φάρμακα και οι άγνωστες αιτίες της εξέλιξης της νόσου [79]. Καθώς τα κλινικά οφέλη της παραδοσιακής ιατρικής αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο, ένας αυξανόμενος αριθμός δραστικών αντικαρκινικών συστατικών από αυτή την ιατρική ανακαλύπτεται, αναλύεται και χρησιμοποιείται. Το κινναμικό οξύ, ειδικότερα, έχει μελετηθεί εκτενώς για τις αντικαρκινικές

του ιδιότητες και μπορεί να προσφέρει νέες κατευθύνσεις και ελπίδα για τη θεραπεία της CML.

Αποτελέσματα προτείνουν τη χρήση του κινναμικού οξέος στη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας, αλλά απαιτείται περαιτέρω βασική έρευνα απαιτείται για την επαλήθευση της αντικαρκινικής του δράσης.

### **1.5 Αντιδιαβητική δράση**

Ο διαβήτης είναι μια χρόνια ασθένεια που απαιτεί επείγουσα παγκόσμια προσοχή, με κύριο χαρακτηριστικό της τη διαρκή αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα [80]. Τα άτομα με διαβήτη επηρεάζονται από αγγειακές παθήσεις πολλαπλών οργάνων, συμπεριλαμβανομένων μικροαγγειακών και μακροαγγειακών επιπλοκών [81], οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε νεφρική ή καρδιαγγειακή νόσο και να αυξήσουν τον κίνδυνο εμφράγματος του μυοκαρδίου, εγκεφαλικού επεισοδίου και ακρωτηριασμού, αυξάνοντας έτσι την αναπηρία και τη θνησιμότητα [82]. Αν και οι τρέχουσες φαρμακευτικές αγωγές μπορούν να μειώσουν αποτελεσματικά τα υψηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα, δεν μπορούν να ρυθμίσουν σταθερά τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα κατά τη διάρκεια της ημέρας και να τα διατηρήσουν σε βέλτιστα επίπεδα. Τα τελευταία χρόνια, με τη συνεχή ανάπτυξη των συμπληρωμάτων διατροφής και των λειτουργικών τροφίμων, ο μηχανισμός των φυτοχημικών συστατικών στην πρόληψη και θεραπεία του διαβήτη και των επιπλοκών του έχει επίσης λάβει ευρεία προσοχή. Μεταξύ πολλών βιοδραστικών ουσιών, το κινναμικό οξύ και τα παράγωγά του, ως ενώσεις που υπάρχουν στη φύση, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία του διαβήτη και των επιπλοκών του.

Το κινναμικό οξύ έχει αποδειχθεί ότι έχει θεραπευτικά οφέλη για τον διαβήτη και τις επιπλοκές του, υποδηλώνοντας πιθανές οδούς για τη θεραπεία της νόσου. Αυτό το εύρημα προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες για μελλοντική έρευνα σχετικά με τη χρήση του κινναμικού οξέος για τη διαχείριση του διαβήτη.

### **1.6 Αντικαταθλιπτικό**

Η κατάθλιψη είναι μια σοβαρή ψυχιατρική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από επίμονη κακή διάθεση, ψυχοκινητική καθυστέρηση, ανηδονία (απώλεια ενδιαφέροντος), χαμηλή

αυτοεκτίμηση και διαταραχές ύπνου [83] και αποτελεί σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας. Αξίζει να σημειωθεί ότι το κινναμικό οξύ και ορισμένα από τα παράγωγά του έχουν δείξει αντικαταθλιπτικές ιδιότητες σε προκλινικές μελέτες, πιθανώς μέσω της μείωσης της νευροφλεγμονής και της ρύθμισης των νευροδιαβιβαστικών συστημάτων [84]. Επί του παρόντος, τα συνήθως χρησιμοποιούμενα αντικαταθλιπτικά περιλαμβάνουν τα τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά (π.χ. αμιτριπτυλίνη, νοτριπτυλίνη και δεμιπραμίνη), τους εκλεκτικούς αναστολείς επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRIs, όπως φλουοξετίνη, σετραλίνη και σιταλοπράμη) και τους αναστολείς μονοαμινοξειδάσης (MAOIs, όπως μοκλοβεμίδη) [85]. Αν και αυτά τα αντικαταθλιπτικά αποδεικνύονται αποτελεσματικά για την πλειονότητα των ασθενών, ορισμένα άτομα δεν επιτυγχάνουν τα επιθυμητά αποτελέσματα. Επιπλέον, αυτά τα φάρμακα συνδέονται με διάφορες ανεπιθύμητες ενέργειες και μπορεί να προκαλέσουν συναισθηματική άμβλυση στους ασθενείς [86]. Επομένως, είναι απαραίτητο να ανακαλυφθούν νέα, ασφαλέστερα και πιο αποτελεσματικά φάρμακα για τη θεραπεία της κατάθλιψης. Πρόσφατα, τα φυσικά προϊόντα που παρουσιάζουν αντικαταθλιπτικές ιδιότητες έχουν αναδειχθεί σε σημαντικό αντικείμενο έρευνας και θα μπορούσαν ενδεχομένως να αποτελέσουν βασική πηγή αντικαταθλιπτικών φαρμάκων.

Το CA παρουσιάζει αντικαταθλιπτική δράση σε ποντίκια, που προκλήθηκε από LPS, και βελτιώνει σημαντικά τη βλάβη του εγκεφάλου. Επομένως, το CA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα πολλά υποσχόμενο φάρμακο για την αντιμετώπιση της κατάθλιψης.

### **1.7 Άλλες φαρμακολογικές επιδράσεις**

Η νευροπροστασία αναφέρεται στη διαδικασία διατήρησης ή αποκατάστασης των νευρικών λειτουργιών μέσω της μείωσης ή πρόληψης της δομικής και λειτουργικής βλάβης των νευρώνων που προκαλείται από τραυματισμό, ασθένεια ή γήρανση. Αυτό επιτυγχάνεται κυρίως μέσω διαφόρων μοριακών μηχανισμών, όπως αντιφλεγμονώδης δράση, αντιοξειδωτική δράση, αντι-αποπτωτική δράση, ρύθμιση της αυτοφαγίας, ρύθμιση της ισορροπίας των ιόντων ασβεστίου και βελτίωση της λειτουργίας των μιτοχονδρίων [87]. Σε ασθένειες όπως το Αλτσχάιμερ και η εγκεφαλική ισχαιμική βλάβη, τα παράγωγα του κινναμικού οξέος επιδεικνύουν σημαντικές νευροπροστατευτικές επιδράσεις ενισχύοντας τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, επιβραδύνοντας έτσι αποτελεσματικά την εξέλιξη της παθολογίας.

Η παχυσαρκία προκαλεί μεταβολικές διαταραχές, οι οποίες στη συνέχεια οδηγούν σε ένα φάσμα ασθενειών, όπως υπερλιπιδαιμία, διαβήτη, υπέρταση και αθηροσκλήρωση [88]

Το άσθμα είναι μια χρόνια ανοσολογική πάθηση που χαρακτηρίζεται κυρίως από φλεγμονή και υπεραντιδραστικότητα των αεραγωγών [89]. Περίπου 300 εκατομμύρια άνθρωποι σε όλο τον κόσμο πάσχουν σήμερα από άσθμα [90]. Έρευνες δείχνουν ότι γενετικοί παράγοντες και κοινωνικές πιέσεις συμβάλλουν στην ανάπτυξη και επιδείνωση του άσθματος, οδηγώντας σε υψηλότερα ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας [91]. Το κινναμικό οξύ έχει αποδειχθεί ότι μειώνει αποτελεσματικά τη διήθηση των λευκοκυττάρων και καταστέλλει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών, μετριαζοντας έτσι την φλεγμονώδη απόκριση και την βλάβη των ιστών στους πνεύμονες των ασθενών με άσθμα [92], παρέχοντας μια νέα κατεύθυνση για την πρόληψη και τη θεραπεία του άσθματος.

### 1.8 Τοξικολογική αξιολόγηση

Το κινναμικό οξύ και τα παράγωγά του παρουσιάζουν γενικά ένα ευνοϊκό προφίλ ασφάλειας, αν και τα επίπεδα τοξικότητάς τους μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με τη δόση, την οδό χορήγησης και τις συγκεκριμένες χημικές τροποποιήσεις. Οι περισσότερες μελέτες *in vitro* και *in vivo* δείχνουν σχετικά χαμηλή οξεία και υποχρόνια τοξικότητα εντός των συμβατικών ορίων δόσης, γεγονός που καθιστά αυτές τις ενώσεις ευρέως χρησιμοποιούμενες σε τρόφιμα, καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα. Ωστόσο, ορισμένα παράγωγα σε υψηλές δόσεις ή χορηγούμενα μέσω συγκεκριμένων οδών μπορεί να προκαλέσουν ανεπιθύμητες αντιδράσεις, γεγονός που δικαιολογεί προσεκτική αξιολόγηση σε κλινικό και βιομηχανικό περιβάλλον [13].

Οι μελέτες οξείας τοξικότητας χρησιμοποιούν συνήθως τη μέση θανατηφόρα δόση (LD50) για την αξιολόγηση των περιθωρίων ασφαλείας. Για παράδειγμα, η από του στόματος χορήγηση κινναμικού οξέος σε δόση έως ~2000 mg/kg σωματικού βάρους σε ζώα προκάλεσε μόνο ήπιες ανεπιθύμητες ενέργειες, υποδηλώνοντας ένα ευρύ περιθώριο ασφαλείας *in vivo* [93]. Αντίθετα, μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι συγκεντρώσεις άνω των 500 μM μπορούν να καταρρεύσουν το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης, να προκαλέσουν έκρηξη αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και να προκαλέσουν απόπτωση στα ηπατοκύτταρα. Επιπλέον, τα πιο λιπόφιλα παράγωγα του κινναμικού οξέος ήταν περίπου πέντε φορές πιο τοξικά για τα κύτταρα του δέρματος από τη μητρική ένωση, ενώ τα αλογονωμένα παράγωγα

ενεργοποίησαν την απόπτωση που προκαλείται από την κασπάση-3 στα νεφρικά σωληναριακά κύτταρα σε συγκέντρωση περίπου 100  $\mu\text{M}$ . Επιπλέον, αυτές οι ενώσεις παρουσιάζουν διφασική απόκριση στη δόση: σε χαμηλές δόσεις (<50  $\mu\text{M}$ ), ενεργοποιούν την οδό Nrf2 για να προσφέρουν αντιοξειδωτική προστασία, ενώ σε υψηλές δόσεις (>200  $\mu\text{M}$ ), αναστέλλουν τη δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) και προκαλούν σιδηροπρωσία. Ιδιαίτερα σε μοντέλα μεταβολικών ασθενειών, το όριο μεταγωγής αντιοξειδωτικού-προοξειδωτικού μειώνεται κατά 60%, επιδεινώνοντας τους κινδύνους βλάβης των οργάνων. Επομένως, η παραδοσιακή αξιολόγηση LD50 παρουσιάζει περιορισμούς και απαιτεί την ενσωμάτωση μιας «στρατηγικής επαλήθευσης τριών σταδίων» που συνδυάζει δοκιμές LD50 σε ζώα, ανίχνευση της κυτταρικής μιτοχονδριακής λειτουργίας και ανάλυση βιοδεικτών ειδικών για όργανα, μαζί με τη βελτιστοποίηση των δοσολογικών σχημάτων μέσω στοχευμένων συστημάτων χορήγησης, για τον ακριβή έλεγχο των κινδύνων τοξικότητας που εξαρτώνται από τη δόση.

Πολλές μελέτες υποχρόνιας και χρόνιας τοξικότητας επικεντρώνονται στις αλλαγές στη λειτουργία του ήπατος και των νεφρών, δεδομένου ότι αυτά τα όργανα διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στον μεταβολισμό και την απέκκριση εξωγενών ουσιών. Σε περίπτωση έκθεσης σε υψηλές δόσεις, τα παράγωγα του κινναμικού οξέος μπορούν να προκαλέσουν σημαντική ηπατοτοξικότητα, η οποία εκδηλώνεται με απότομη αύξηση των επιπέδων των τρανσαμινασών (ALT, AST) στον ορό, η οποία σχετίζεται άμεσα με τη μεταβολική συσσώρευση των ενώσεων στο ήπαρ. Ταυτόχρονα, μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο νεφρικό σωληναριακό επιθήλιο, παρεμποδίζοντας την παραγωγή ούρων και τις λειτουργίες απέκκρισης. Ωστόσο, αυτή η τοξικότητα των οργάνων παρουσιάζει σαφή εξάρτηση από τη δόση. Σε μέτριες δόσεις, τα περισσότερα παράγωγα του κινναμικού οξέος προκαλούν μόνο ελαφρές και αναστρέψιμες αλλοιώσεις στη δομή των οργάνων ή στους βιοχημικούς δείκτες, όπως ήπια αύξηση των τρανσαμινασών του ορού (ALT, AST) ή μικρές αλλαγές στο νεφρικό σωληναριακό επιθήλιο [19]. Οι κλινικές θεραπευτικές δόσεις έχουν υποβληθεί σε αυστηρές αξιολογήσεις ασφάλειας, παρουσιάζοντας ελάχιστο κίνδυνο τοξικότητας. Για τα παράγωγα που περιέχουν πολλαπλές υδροξυλομάδες ή αυξημένη λιποφιλικότητα, πρέπει να δοθεί πρόσθετη προσοχή στην πιθανή κυτταροτοξικότητα ή στις ανοσολογικές αντιδράσεις σε υψηλές δόσεις [94]. Επιπλέον, δεδομένου ότι το κινναμικό οξύ είναι μια αρωματική ένωση,

ορισμένα άτομα μπορεί να είναι αλλεργικά σε αυτό ή στα παράγωγά του, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν τοπικές αλλεργικές αντιδράσεις ή δερματίτιδα εξ επαφής, ειδικά όταν αυτά τα παράγωγα ενσωματώνονται σε καλλυντικά και προϊόντα προσωπικής φροντίδας. Συνιστάται η διεξαγωγή δοκιμών επιδερμίδας [95]. Γενικά, αυτές οι ανεπιθύμητες αντιδράσεις συνήθως υποχωρούν ή εξαφανίζονται μετά τη διακοπή της χρήσης.

Όσον αφορά τη γενετοξικότητα και την καρκινογένεση, οι περισσότερες μελέτες δεν έχουν εντοπίσει σαφείς μεταλλαξιογόνους ή ογκογόνους κινδύνους από το κινναμικό οξύ και τα κοινά παράγωγά του σε τυπικές δόσεις. Ορισμένες έρευνες έχουν μάλιστα υποδείξει ότι οι εστέρες του καφεϊκού οξέος και τα παράγωγα με πολλαπλές υδροξυλομάδες ενδέχεται να παρουσιάζουν αντικαρκινικές ιδιότητες, όπως η πρόκληση απόπτωσης ή η μείωση του οξειδωτικού στρες [96]. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα μεγάλης κλίμακας και μακροπρόθεσμης διάρκειας, ιδίως σε διαγονιδιακά ζωικά μοντέλα, προκειμένου να αποκλειστούν πιθανοί κίνδυνοι, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για υψηλές δόσεις ή παρατεταμένη πρόσληψη.

Από κλινική και διατροφική άποψη, τα παράγωγα του κινναμικού οξέος θεωρείται ότι προσφέρουν ένα σχετικά ευρύ θεραπευτικό φάσμα. Σε προκλινικές μελέτες, τα ζώα παρακολουθούνται συνήθως στενά ως προς τη λειτουργία του ήπατος και των νεφρών, τους βιοχημικούς δείκτες και τις ανοσολογικές αντιδράσεις, προκειμένου να διασφαλίζεται η ασφάλειά τους. Επειδή το κινναμικό οξύ βρίσκεται σε μεγάλη ποσότητα στη φύση και στην καθημερινή διατροφή, πολλά παράγωγά του έχουν λάβει την πιστοποίηση GRAS (Generally Recognized as Safe-Γενικά Αναγνωρισμένα ως Ασφαλή) [19,97]. Ωστόσο, η αύξηση της συγκέντρωσής τους σε προϊόντα διατροφής ή η εφαρμογή νανο-μεταλλικών σκευασμάτων εξακολουθεί να απαιτεί την τήρηση των κανονιστικών οδηγιών και τη συστηματική τοξικολογική αξιολόγηση.

Με την πρόοδο της νανοτεχνολογίας, τα παράγωγα του κινναμικού οξέος ενσωματώνονται όλο και περισσότερο σε νανοφορείς και νανογαλακτώματα για τη βελτίωση της διαλυτότητας και της βιοδιαθεσιμότητάς τους. Ωστόσο, τέτοιες νανοκλίμακες συνθέσεις ενδέχεται να δημιουργήσουν νέα προβλήματα ασφάλειας (π.χ. απροσδόκητη συσσώρευση στους ιστούς ή δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος). Κατά συνέπεια, η έρευνα σχετικά με τα νανοσυνθετικά παράγωγα του κινναμικού οξέος πρέπει να εξισορροπεί προσεκτικά τη

βελτιωμένη αποτελεσματικότητα με τις μακροπρόθεσμες παραμέτρους ασφάλειας. Συνολικά, οι ολοκληρωμένες τοξικολογικές αξιολογήσεις του κινναμικού οξέος και των παραγώγων του — σε διάφορες μεθόδους χορήγησης, πληθυσμούς ασθενών και παθολογικές καταστάσεις — παραμένουν απαραίτητες πριν από την ευρύτερη κλινική υιοθέτηση και βιομηχανική χρήση.

### **1.9 Τρέχουσα κατάσταση εφαρμογής και προοπτικές ανάπτυξης**

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι το κινναμικό οξύ και τα φυσικά παράγωγά του (από φλοιό/κλαδιά κανέλας) διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικών δραστηριοτήτων, συμπεριλαμβανομένων αντιφλεγμονωδών και αντικαρκινικών αποτελεσμάτων. Έχουν αποδείξει σημαντικό θεραπευτικό δυναμικό κατά των λοιμώξεων (βακτηριακών και μυκητιασικών) και άλλων ασθενειών. Στην ιατρική, το κινναμικό οξύ έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία επιφανειακών μυκητιασικών λοιμώξεων του δέρματος και ακόμη και ως συμπλήρωμα διατροφής για τη μεταβολική υγεία. Ορισμένα παράγωγα έχουν βρει εξειδικευμένες κλινικές χρήσεις. Για παράδειγμα, το μονομεθοξικινναμικό οξύ χρησιμοποιείται συμπληρωματικά για την ηλιακή δερματίτιδα. Στη βιομηχανία καλλυντικών, το οκτυλομεθοξικινναμικό είναι ένα βασικό συστατικό που φιλτράρει την υπεριώδη ακτινοβολία. Με βιταμίνη C παράγει αποτελέσματα λεύκανσης του δέρματος, ενώ η κινναμυλική αλκοόλη χρησιμεύει τόσο ως άρωμα όσο και ως συντηρητικό. Λόγω των εκτεταμένων αυτών ευεργεσιών στην ανθρώπινη υγεία, το κινναμικό οξύ και τα παράγωγά του παρουσιάζουν σημαντικές προοπτικές ως φυσικά προϊόντα υγείας. Συνθετικά παράγωγα του κινναμικού οξέος με ποικίλες δομές μπορούν να συντεθούν μέσω χημικής σύνθεσης ή τεχνικών βιολογικού μετασχηματισμού, προσφέροντας ενισχυμένη φαρμακευτική αποτελεσματικότητα και μειωμένες παρενέργειες. Η σε βάθος έρευνα των φαρμακολογικών μηχανισμών του κινναμικού οξέος, μαζί με την αξιολόγηση των φαρμακολογικών δραστηριοτήτων των παραγώγων του, θα μπορούσε όχι μόνο να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα του κινναμικού οξέος, αλλά και να παρέχει μια ισχυρότερη βάση για τις κλινικές εφαρμογές του. Πρόσφατες μελέτες υποδηλώνουν ότι τα νανοφάρμακα, ως καινοτόμα συστήματα χορήγησης φαρμάκων, μπορούν να ενισχύσουν σημαντικά τη σταθερότητα, τη διαλυτότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα των φαρμάκων. Τα νανοσωματίδια που σχηματίζονται μέσω της αυτοσυναρμολόγησης της βερβερίνης και του κινναμικού οξέος δεν απαιτούν καμία ειδική επεξεργασία κατά τη διάρκεια αυτής της διεργασίας. Αυτά τα νανοσωματίδια εμφανίζουν σημαντικά μεγαλύτερη

αποτελεσματικότητα από τα αντιβιοτικά πρώτης γραμμής, όπως η νορφλοξασίνη, η αμοξικιλίνη και η τετρακυκλίνη, στην αναστολή του πολυανθεκτικού *Staphylococcus aureus*. Επιπλέον, ο συνδυασμός κινναμικού οξέος και μανγκιφερίνης παρουσιάζει μια πολλά υποσχόμενη προοπτική για την ανάπτυξη ενός νέου θεραπευτικού παράγοντα για τη διαχείριση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Η πρόοδος στην ανάπτυξη νανοφαρμάκων που ενσωματώνουν κινναμικό οξύ και τα παράγωγά του θα μπορούσε να οδηγήσει σε καλύτερα ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων, βελτιώνοντας έτσι τόσο την αποτελεσματικότητα όσο και την ασφάλεια των θεραπειών. Επομένως, είναι ζωτικής σημασίας για τη μελλοντική έρευνα να εντατικοποιήσει την ανάπτυξη και την εφαρμογή του κινναμικού οξέος, προκειμένου να ανταποκριθεί στις αυξανόμενες απαιτήσεις της αγοράς και να συμβάλει σημαντικά στην ανθρώπινη υγεία.

### **1.10 Συμπεράσματα**

Το κινναμικό οξύ (CA), ένα κρίσιμο δραστικό συστατικό των παραδοσιακών φαρμακευτικών φυτών, παρουσιάζει σημαντική επιστημονική αξία και βιομηχανικό δυναμικό στη σύγχρονη φαρμακευτική καινοτομία. Εκτενείς μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι αυτή η ένωση και τα παράγωγά της διαθέτουν βασικές φαρμακολογικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων αντιφλεγμονωδών και αντικαρκινικών αποτελεσμάτων. Εφαρμόζοντας καινοτόμες μεθόδους, όπως η δομική τροποποίηση και η νανοτεχνολογία, οι ερευνητές έχουν καταφέρει να ξεπεράσουν τους περιορισμούς των φυσικών ενώσεων, επιτρέποντας την ανάπτυξη πρωτοποριακών εφαρμογών στα φαρμακευτικά προϊόντα και τα καλλυντικά. Συγκεκριμένα, τα παράγωγα CA που έχουν σχεδιαστεί για σοβαρές ασθένειες, όπως ο καρκίνος, οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές και οι μεταβολικές ασθένειες, παρουσιάζουν πολύ ελπιδοφόρες προοπτικές κλινικής εφαρμογής. Η τρέχουσα έρευνα επικεντρώνεται στην αποσαφήνιση των σχέσεων δομής-δραστηριότητας, στην ανάπτυξη παραγώγων υψηλής δραστηριότητας και στην προώθηση συστημάτων χορήγησης νανοφαρμάκων με βάση τα παράγωγα CA. Αυτές οι στρατηγικές αντιμετωπίζουν κρίσιμα εμπόδια, όπως η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα και η ανεπαρκής στόχευση, ενισχύοντας έτσι σημαντικά τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα και μειώνοντας τις ανεπιθύμητες ενέργειες. Πολλαπλές προκλινικές και κλινικές μελέτες πρώιμου σταδίου αξιολογούν συστηματικά την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των παραγώγων CA, θέτοντας τις βάσεις για την επακόλουθη μεταφορά

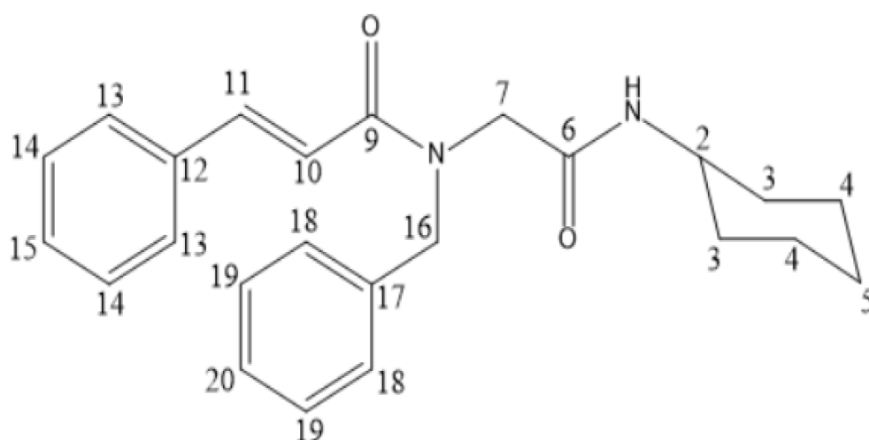
στην πράξη. Για την επιτάχυνση της καινοτομίας, είναι επιτακτική η δημιουργία ενός μηχανισμού συνεργασίας μεταξύ βιομηχανίας, ακαδημαϊκής κοινότητας και ερευνητικών ιδρυμάτων. Τα μελλοντικά υποψήφια παράγωγα CA με υψηλό δυναμικό, που αναπτύσσονται μέσω δομικής βελτιστοποίησης και προηγμένων τεχνολογιών σύνθεσης, είναι έτοιμα να γίνουν στρατηγικοί πόροι στον κλάδο της υγειονομικής περίθαλψης. Αυτές οι καινοτομίες όχι μόνο θα προσφέρουν ασφαλέστερες και αποτελεσματικότερες λύσεις για την πρόληψη ασθενειών και τη διαχείριση της υγείας, αλλά θα επιτρέψουν επίσης μια ταχεία μετάβαση από την εργαστηριακή έρευνα στην κλινική εφαρμογή, δημιουργώντας τελικά μεγαλύτερη αξία στην ιατρική και την υγειονομική περίθαλψη.

## 1.11 Θεωρία στις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν

### 1.11.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

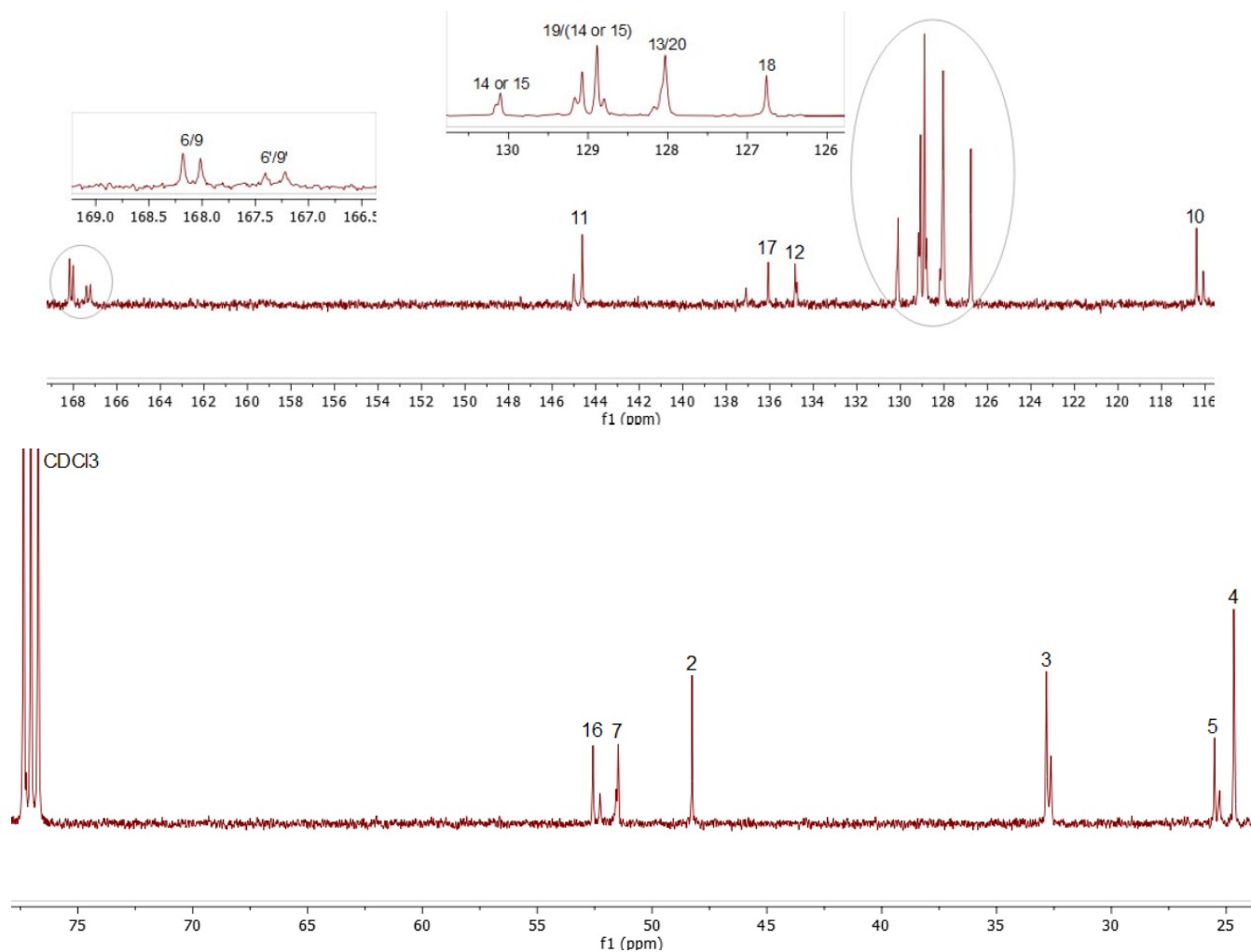
Για τη μελέτη του μορίου NGI25 χρησιμοποιήθηκαν όλες οι γνωστές ομοπυρηνικές και ετεροπυρηνικές τεχνικές φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, 2D COSY, 2D NOESY, 2D HSQC και 2D HMBC). Για τις τεχνικές αυτές μπορείτε να αντλήσετε πληθώρα πληροφοριών από το βιβλίο των Θ. Μαυρομούστακο κα συν-συγγραφέων [98].

Είναι ενδιαφέρον να δοθούν κάποιες απαραίτητες προκαταρκτικές πληροφορίες για το μόριο του οποίου η δομή παρουσιάζεται παρακάτω (Σχήμα 1.2).



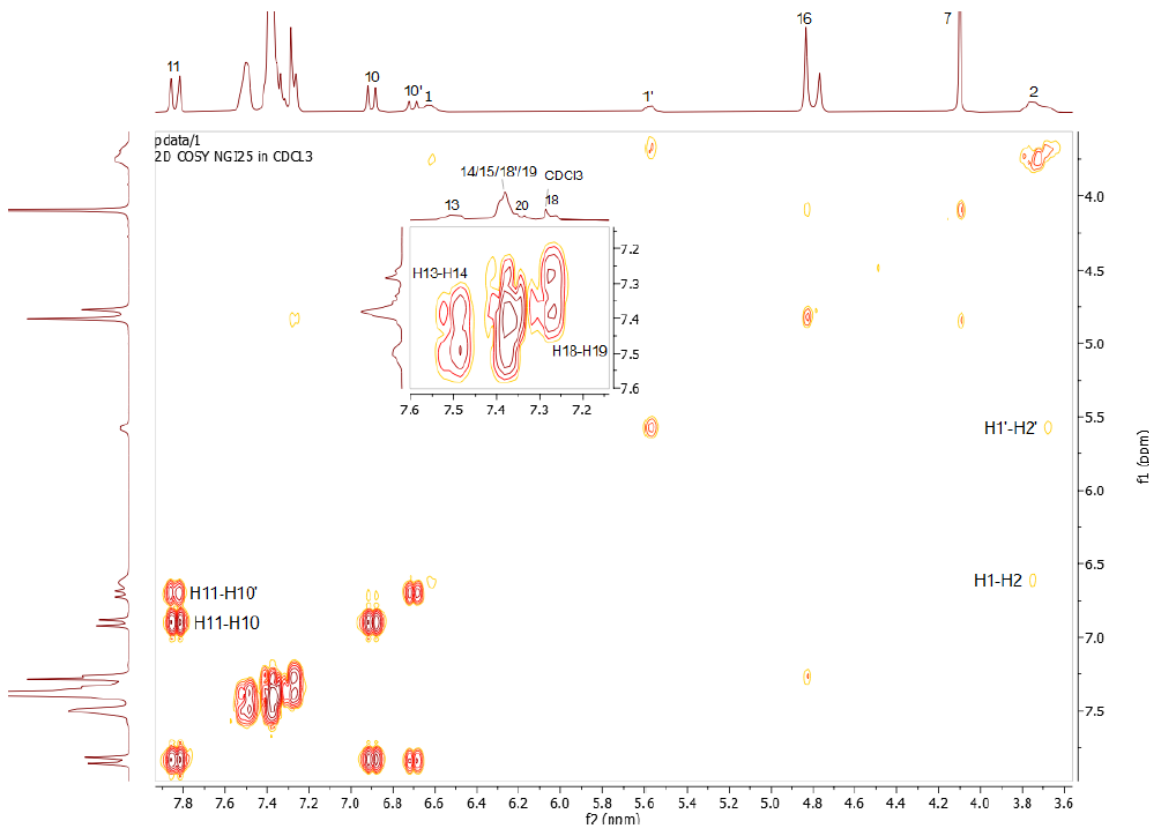
Σχήμα 1.2: Δομή του μορίου NGI25 που φέρει αρίθμηση στους άνθρακες του.

Κατ' αρχή στο ταυτοποιημένο φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR (Εικόνα 1.2) παρατηρούνται τέσσερις κορυφές στην καρβονυλική περιοχή. Αυτό είναι έκδηλο ότι το μόριο παρουσιάζει δύο διαφορετικές διαμορφώσεις στον δευτεριωμένο διαλύτη του χλωρορμίου. Η διαμορφωτική ευελιξία του μορίου είναι αναμενόμενο καθώς τα δύο καρβονύλια ανήκουν σε αμιδικό δεσμό ο οποίος μπορεί να λάβει *trans* και *cis* διαμορφώσεις. Οι χημικές μετατοπίσεις σε θέσεις κοντά στον αμιδικό δεσμό επηρεάζονται και παρατηρούνται επίσης διπλές κορυφές (π.χ. θέσεις 10,11 και 17).



**Εικόνα 1.2:** Φάσμα  $^{13}\text{C}$  του NGI25 σε  $\text{CDCl}_3$  σε θερμοκρασία δωματίου. Το πείραμα εκτελέστηκε στον φασματογράφο 400 MHz Avance ο οποίος είναι εγκαταστημένος στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας.

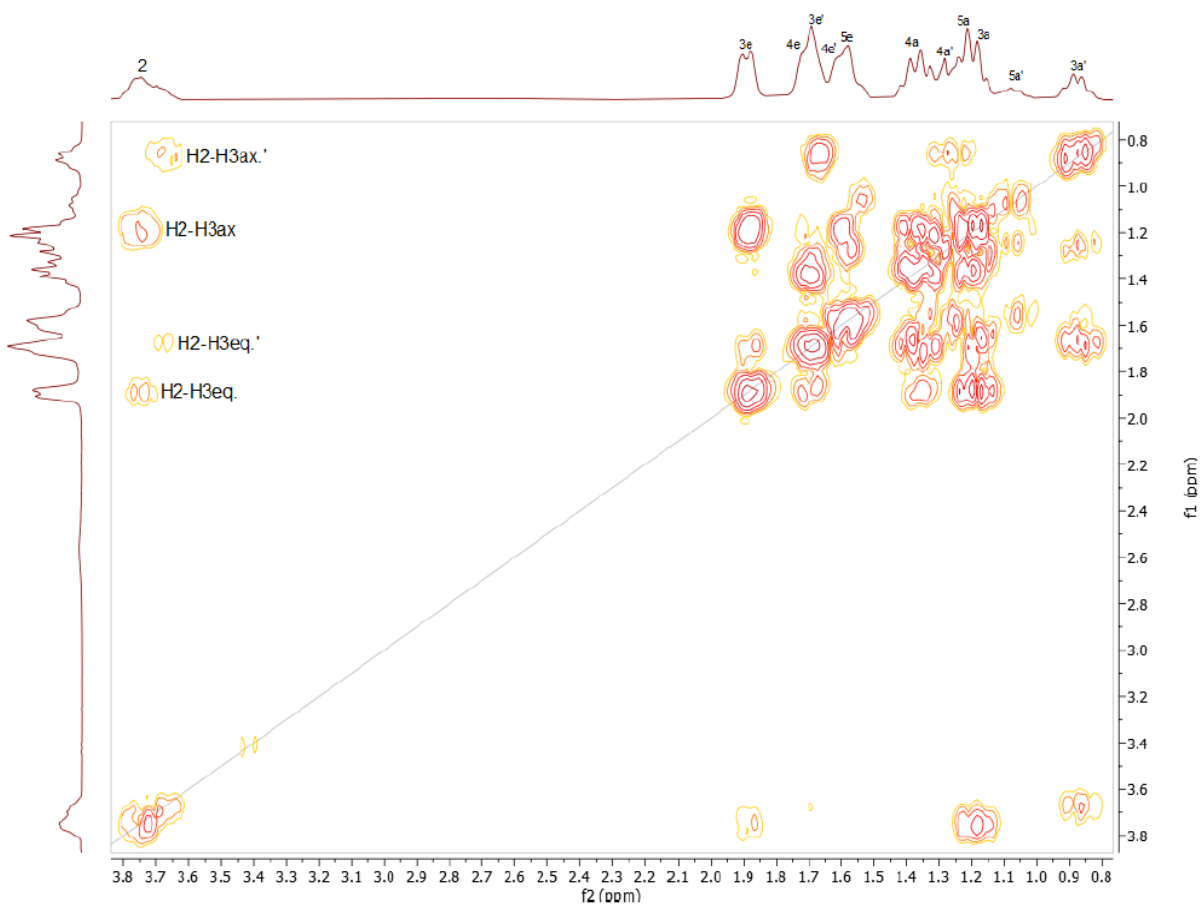
Στην παρακάτω Εικόνα 1.3 παριστάνεται το φάσμα 2D COSY. Είναι σαφές από το φάσμα ότι το H-10 υπάρχει σε δύο διαμορφώσεις και συσχετίζεται με το H11.



**Εικόνα 1.3:** Φάσμα 2D COSY του NGI25 στη περιοχή 3,6-7,9 ppm σε  $\text{CDCl}_3$  σε θερμοκρασία δωματίου. Το πείραμα εκτελέστηκε στον φασματογράφο 400 MHz Avance ο οποίος είναι εγκαταστημένος στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας.

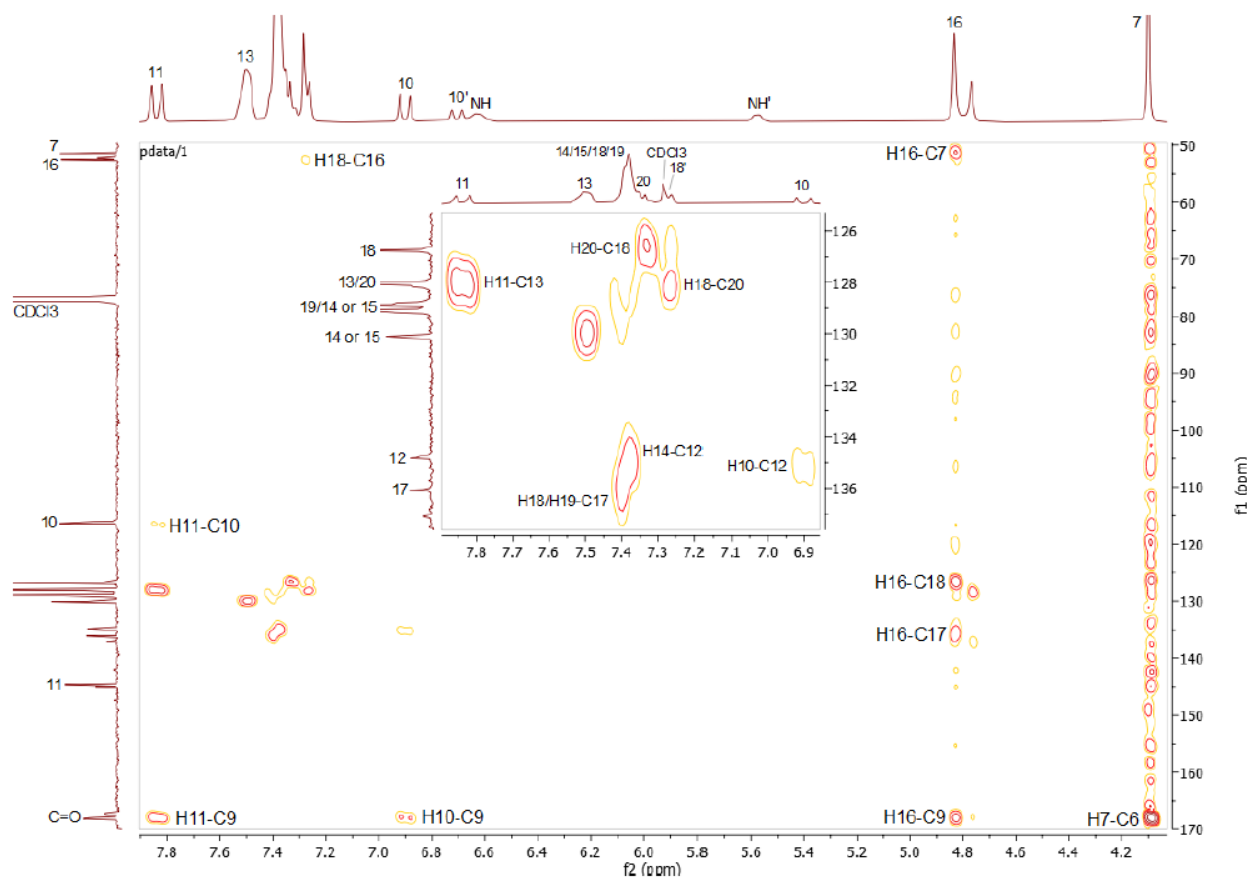
Οι παρατηρήσεις αυτές στη φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ήταν καθοριστικές για να εφαρμοστεί θεωρητική μελέτη των διαμορφώσεων του Μορίου.

Εξαιρετικά ενδιαφέρον είναι να αναφερθεί και η πολυπλοκότητα του φάσματος της κυκλοεξανικής περιοχής. Παρόλη όμως την πολυπλοκότητα του φάσματος η φασματοσκοπία δύο διαστάσεων 2D COSY ήταν επαρκής για να ταυτοποιηθεί. Βοηθητική ήταν η παρατήρηση ότι τα ισημερινά του ίδιου άνθρακα συντονίζονταν σε χαμηλότερο πεδίο σε σχέση με τα αξονικά (Εικόνα 1.4).



**Εικόνα 1.4:** Φάσμα 2D COSY του NIG25 στη περιοχή 0-4 ppm CDCl<sub>3</sub> σε θερμοκρασία δωματίου. Το πείραμα εκτελέστηκε στον φασματογράφο 400 MHz Avance ο οποίος είναι εγκαταστημένος στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας.

Καθοριστικό φάσμα για την ταυτοποίηση του μορίου ήταν το ετεροπυρηνικό φάσμα δύο διαστάσεων 2D HMBC. Όπως δείχνεται παρακάτω οι συζεύξεις <sup>2</sup>J και <sup>3</sup>J ήταν καθοριστικές για την ταυτοποίηση των τεταρτοταγών ανθράκων (Εικόνα 1.5).

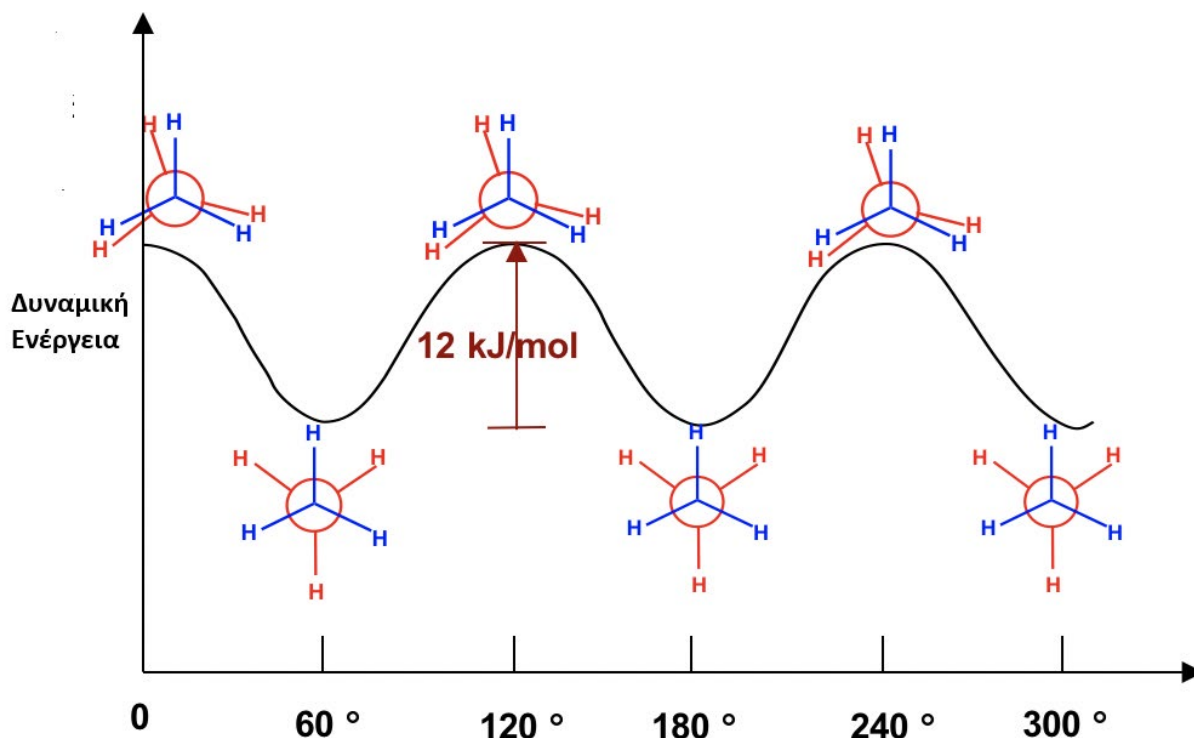


**Εικόνα 1.5:** Φάσμα  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  2D HMBC του NGI25 στην περιοχή 4.2-7.8 ppm σε θερμοκρασία δωματίου. Το πείραμα εκτελέστηκε στον φασματογράφο 400 MHz Avance ο οποίος είναι εγκαταστημένος στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας.

### 1.11.2 Διαμορφωτική Ανάλυση

Η εύρεση του ολικού ελαχίστου απαιτεί τη χρήση αλγορίθμων διαμορφωτικής ανάλυσης. Παράδειγμα τέτοιου αλγορίθμου αποτελεί αυτό της συστηματικής ανάλυσης (grid scan), όπου διερευνάται η δυναμική ενέργεια του μορίου κατόπιν συστηματικής περιστροφής γύρω από όλες τις διέδρες γωνίες με καθορισμένο βήμα (π.χ.  $10^\circ$ ). Η μεθοδολογία αυτή είναι εφαρμόσιμη μόνο όταν ο αριθμός των ευέλικτων διέδρων γωνιών είναι μικρός. Οι πολλαπλοί δυνατοί συνδυασμοί των τιμών τους αυξάνουν δραματικά τον υπολογιστικό χρόνο και την απαιτούμενη υπολογιστική ισχύ. Στην περίπτωση αυτήν εφαρμόζονται αλγόριθμοι στοχαστικής αναζήτησης (Monte Carlo), όπου διερευνάται ο διαμορφωτικός χώρος κατά τυχαίο τρόπο,

καθώς και η Μοριακή Δυναμική, όπου τα μόρια λαμβάνουν κινητική ενέργεια (μέσω αύξησης της θερμοκρασίας) και προσομοιώνεται η κίνησή τους για κάποιο χρονικό διάστημα. Το τελευταίο στάδιο όλων των μεθοδολογιών εξεύρεσης χαμηλών ενεργειακών διαμορφώσεων με την εξερεύνηση του διαμορφωτικού χώρου αποτελεί η εφαρμογή ενέργειας ελαχιστοποίησης (Εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6: Οι ενέργειες του αιθανίου όταν περιστρέφεται κατά διάφορες διέδρες γωνίες. Αυτό ουσιαστικά είναι η μέθοδος Grid Scan. Περιστρέφουμε μία ή περισσότερες διέδρες γωνίες ώστε να πετύχουμε ενέργεια του μορίου με ελάχιστη τιμή.

Οι μεθοδολογίες αυτές επιτρέπουν την υπέρβαση των τοπικών ελαχίστων και την πιθανή εύρεση των ολικών ελαχίστων. Το αποτέλεσμα των θεωρητικών αυτών μελετών είναι η εύρεση αριθμού πιθανών βιοδραστικών διαμορφωμένων. Παράλληλα, μία μέση ή μέσες διαμορφώσεις του μορίου θα προκύψουν από τη μελέτη του με χρήση Φασματοσκοπίας NMR σε ένα ή περισσότερα περιβάλλοντα. Οι διαγνωστικές παράμετροι που χρησιμοποιούνται για τη διαμορφωτική ανάλυση στη Φασματοσκοπία NMR είναι οι γειτνιαζουσες σταθερές σύζευξης και το φαινόμενο Overhauser. Το φαινόμενο Overhauser παρατηρείται σε πυρήνες

οι οποίοι βρίσκονται σε χωρική εγγύτητα. Με την καταγραφή αυτών των χωρικά γειτνιαζόντων πυρήνων μπορεί να υπολογιστεί η διαμόρφωση η οποία είναι συνεπής με όλες αυτές τις παρατηρούμενες χωρικές αποστάσεις. Οι χωρικές αποστάσεις μετρώνται με την ολοκλήρωση των κορυφών που συσχετίζονται μέσω χωρικής εγγύτητας. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται Γεωμετρία Απόστασης και επιτυγχάνεται με κατάλληλα λογισμικά. Για τον υπολογισμό τους χρειάζεται μία χωρική απόσταση αναφοράς [99].

### 1.11.3 Μοριακή Πρόσδεση

Η μοριακή πρόσδεση αποτελεί μέθοδο που χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης ( $\Delta G$ ) των υποψήφιων φαρμακευτικών μορίων στα μακρομόρια-στόχους. Η αρχή μεθόδου είναι η ίδια, τόσο για τη μοριακή πρόσδεση χημικών μορίων στις πρωτεΐνες-υποδοχείς όσο και για τη μοριακή πρόσδεση στο γενετικό υλικό (DNA/RNA).

Στους τομείς της βιολογίας και της βιοχημείας, η πρόσδεση του μορίου-προσδέτη στον υποδοχέα επάγει συγκεκριμένο σήμα, που μεταφράζεται σε βιολογικό αποτέλεσμα. Έτσι, όταν μιλάμε για μόριο-προσδέτη, εννοούμε κάποια ένωση που συντίθεται από τον οργανισμό είτε κάποιο άλλο βιομόριο. Ωστόσο, στον τομέα της φαρμακοχημείας, ο προσδέτης περιορίζεται σε φαρμακευτικά μόρια (ΦΜ) ή δυνάμει φαρμακευτικά μόρια. Η γνώση των αλληλεπιδράσεων του φαρμακευτικού μορίου με τον υποδοχέα σε μοριακό επίπεδο είναι ουσιαστική, προκειμένου να σχεδιαστούν καινοτόμα προϊόντα με βελτιωμένη φαρμακευτική δράση. Δεδομένου ότι ο υποδοχέας είναι ένα μεγάλο μοριακού βάρους μόριο (συνήθως πρωτεΐνη), το ΦΜ θα προσδένεται σε κάποια συγκεκριμένη περιοχή του, η οποία ονομάζεται θήκη ή κοιλότητα πρόσδεσης ή ενεργό κέντρο του υποδοχέα.

Η κινητήρια δύναμη που ωθεί την πρόσδεση των φαρμακευτικών μορίων στον υποδοχέα είναι οι στερεοηλεκτρονικές τους ιδιότητες. Αυτές είναι που προσδιορίζουν αν θα εξασκηθούν ελκτικές/απωστικές, στερικές ή ηλεκτροστατικές δυνάμεις. Οι διάφορες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται, όταν τα φαρμακευτικά μόρια προσεγγίζουν τον υποδοχέα, είναι σημαντικές, γιατί στοχεύουν στη θεωρητική μελέτη και στον σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών προϊόντων, μέσω της γνώσης της μοριακής βάσης μίας ασθένειας.

Στόχος του πειράματος μοριακής πρόσδεσης αποτελεί η πρόβλεψη των μοριακών αλληλεπιδράσεων που σχηματίζονται μεταξύ του μορίου και της πρωτεΐνης, αφού το μικρό μόριο έχει εισέλθει στην πρωτεΐνη. Η μοριακή πρόσδεση αποτελεί μέθοδο που επιτρέπει την πρόβλεψη της επικρατέστερης περιοχής της πρωτεΐνης στην οποία μπορεί να προσδεθεί το εκάστοτε μόριο.

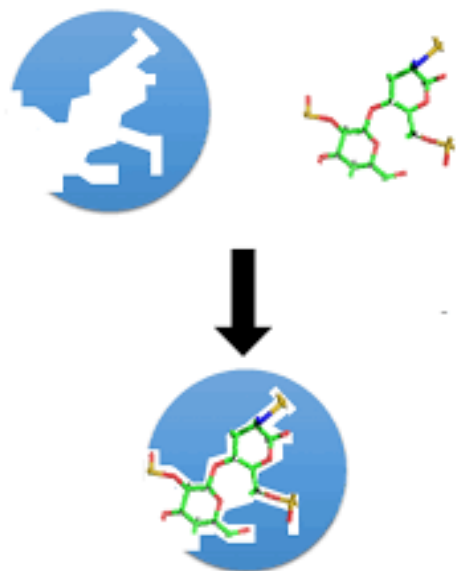
Εκτός από την περιοχή της πρωτεΐνης όπου ευνοείται η πρόσδεση του κάθε μορίου, η συγκεκριμένη μέθοδος επιτρέπει τον υπολογισμό της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης δημιουργίας του συμπλόκου «ενζύμου-προσδέτη» ( $\Delta G_{\text{bind}}$ ). Η τιμή αυτή επιτρέπει την πρόβλεψη της ισχύος της πρόσδεσης και παρέχει τη δυνατότητα εύρεσης νέων μορίων που προσδένονται ισχυρά στην κάθε πρωτεΐνη (Εξίσωση 1.1).

$$\Delta G_{\text{bind}} = -Rt \ln K \quad (1.1)$$

Όπου  $\Delta G$  αποτελεί την ελεύθερη ενέργεια,  $R$  είναι η παγκόσμια σταθερά αερίων,  $T$  είναι η θερμοκρασία και  $K$  η σταθερά ισορροπίας.

Για τη μοριακή πρόσδεση αναπτύχθηκαν δύο μοντέλα. Το πρώτο μοντέλο είναι εκείνο του κλειδιού–κλειδαριάς, που προτάθηκε από τον Fischer το 1899 και σύμφωνα με το οποίο, η δομή του ενεργού κέντρου του υποδοχέα είναι τέτοια ώστε να προσαρμόζεται η χημική ένωση τέλεια στον υποδοχέα, όπως αντίστοιχα ένα κλειδί προσαρμόζεται τέλεια σε μια κλειδαριά. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η δομή του ενζύμου παραμένει άκαμπτη (rigid), ενώ η διαμόρφωση του χημικού μορίου μεταβάλλεται, ώστε να προσαρμοστεί στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Το δεύτερο μοντέλο είναι αυτό της επαγόμενης πρόσδεσης που προτάθηκε από τον Koshland το 1958). Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, θεωρείται ότι αρχικά πραγματοποιείται η πρόσδεση του χημικού μορίου στο ένζυμο και έπειτα προσαρμόζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ομάδων του μορίου και του ενεργού κέντρου, ώστε να οδηγήσουν στην τέλεια εφαρμογή. Σε αυτήν την περίπτωση μεταβάλλεται, τόσο η διαμόρφωση του ενεργού ή αλλοστερικού κέντρου του ενζύμου όσο και η διαμόρφωση του φαρμακευτικού μορίου. Το μοντέλο αυτό είναι πιο ρεαλιστικό και θα χρησιμοποιηθεί στην ερευνητική μας αυτή δραστηριότητα [99] (Εικόνα 1.7).



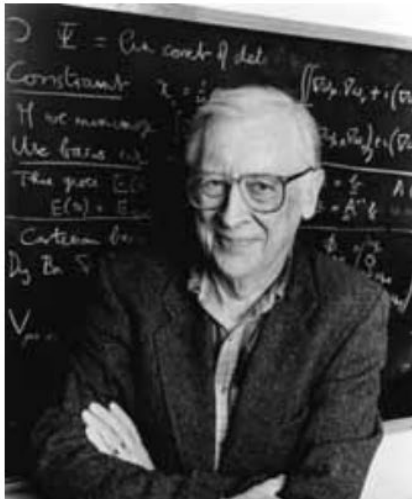
**Εικόνα 1.7: Μοριακή πρόσδεση.** Ο προσδέτης καλύπτει μια συγκεκριμένη κοιλότητα του βιομορίου. Αυτό ονομάζεται ενεργό ή αλλοστερικό κέντρο. Κατά την πρόσδεση συνήθως ο προσδέτης και το ενεργό κέντρο μεταβάλλονται.

#### 1.11.4 Θεωρία συναρτησιακού πυκνότητας και Ημιεμπειρικοί υπολογισμοί

Για τον υπολογισμό της ηλεκτρονιακής ενέργειας προτάθηκε το 1964 από τους Hohenberg και Kohn και ονομάστηκε Θεωρία Συναρτησιακού Πυκνότητας (Density Functional Theory – DFT). Μέσω της DFT επιχειρείται ο υπολογισμός της συνολικής ηλεκτρονιακής ενέργειας, θεωρώντας μόνο τη συνολική κατανομή της ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $\rho(r)$ . Με αυτόν τον τρόπο, ένα πρόβλημα πολλών συντεταγμένων ( $3N$  όπου 3 είναι οι καρτεσιανές συντεταγμένες και  $N$  ο αριθμός των ηλεκτρονίων του συστήματος) μετατρέπεται σε ένα πρόβλημα τριών μόνο συντεταγμένων, αφού επαρκεί η γνώση των συντεταγμένων της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Περισσότερα για τη θεωρία αυτή μπορεί να αντλήσετε από τη βιβλιογραφική αναφορά. Η μέθοδος αυτή κατατάσσεται στις μεθόδους κβαντικής χημείας. Μια περισσότερο απλοποίηση της εξίσωσης Schrödinger η οποία αποτελεί την εξίσωση αναφοράς είναι οι ημιεμπειρικοί υπολογισμοί [99].

Το υψηλό κόστος των *ab initio* MO υπολογισμών οδήγησε σε αρκετές προσεγγίσεις. Για παράδειγμα πολλά ολοκληρώματα προσεγγίζονται με συναρτήσεις με εμπειρικούς

παράμετρους που προσαρμόζονται ώστε το πείραμα να συμφωνεί με τη θεωρία. Παραδείγματα ημιεμπειρικών μεθόδων αποτελούν οι μέθοδοι: NDDO, PM3, CNDO, ZDO, AM1 κ.λπ.



John Pople



Michael Dewar

Εικόνα 1.8: Μεγάλες προσωπικότητες της κβαντομηχανικής

### 1.11.5 Μοριακή Δυναμική

Η μέθοδος της Μοριακής Δυναμικής είναι μία μέθοδος μοριακών προσομοιώσεων, η οποία περιγράφει τη δυναμική του συστήματος (δηλαδή τη χρονική του εξέλιξη), υπολογίζοντας μέσες τιμές των ιδιοτήτων ισορροπίας. Εκκινώντας από μία ελαχιστοποιημένη ενεργειακά διαμόρφωση του υπό μελέτη συστήματος και ορίζοντας αρχικές ταχύτητες σύμφωνα με την κατανομή Maxwell-Boltzmann, επιλύονται οι εξισώσεις κίνησης του Νεύτωνα και με αυτόν τον τρόπο προβλέπονται οι νέες θέσεις των σωματιδίων του συστήματος έπειτα από χρόνο  $t$ . Η Μοριακή Δυναμική είναι μία μέθοδος αιτιοκρατική (ή αλλιώς ντετερμινιστική), δηλαδή, κάθε μελλοντική κατάσταση του συστήματος μπορεί να προβλεφθεί από την τρέχουσα κατάστασή του.

Σύμφωνα με τους νόμους κίνησης του Νεύτωνα, ένα σώμα συνεχίζει να κινείται ευθεία σε συγκεκριμένη και σταθερή ταχύτητα (ευθύγραμμη ομαλή κίνηση), έως ότου του ασκηθεί μία

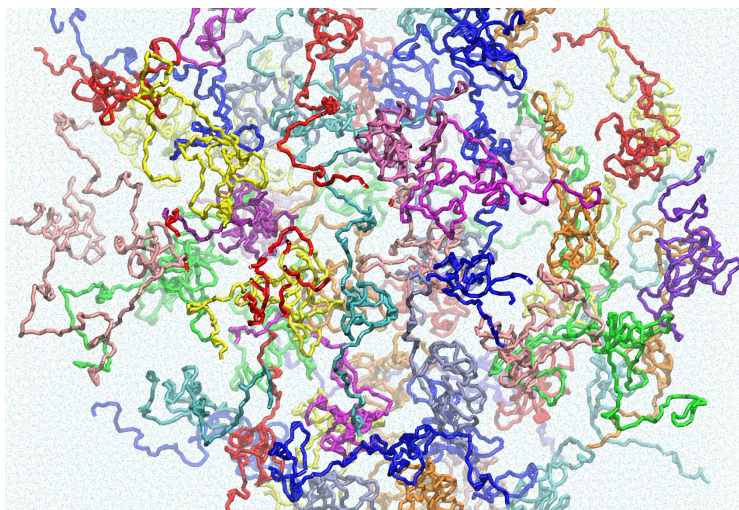
δύναμη. Μπορεί να υπολογιστεί η τροχιά του σωματιδίου  $i$ , μάζας  $m_i$ , πάνω στο οποίο ασκείται μία δύναμη  $F$ , επιλύοντας τη διαφορική εξίσωση (Εξίσωση 1.2) που προκύπτει από τον δεύτερο νόμο του Νεύτωνα. Αρχές Υπολογιστικής Χημείας σ. 223 [99].

$$F = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} \quad (1.2)$$

όπου  $F$  αποτελεί τη δύναμη που ασκείται στο σωματίδιο  $i$ ,  $m_i$  είναι η μάζα του σωματιδίου  $i$  και  $dt$  είναι ένα μικρό χρονικό διάστημα.

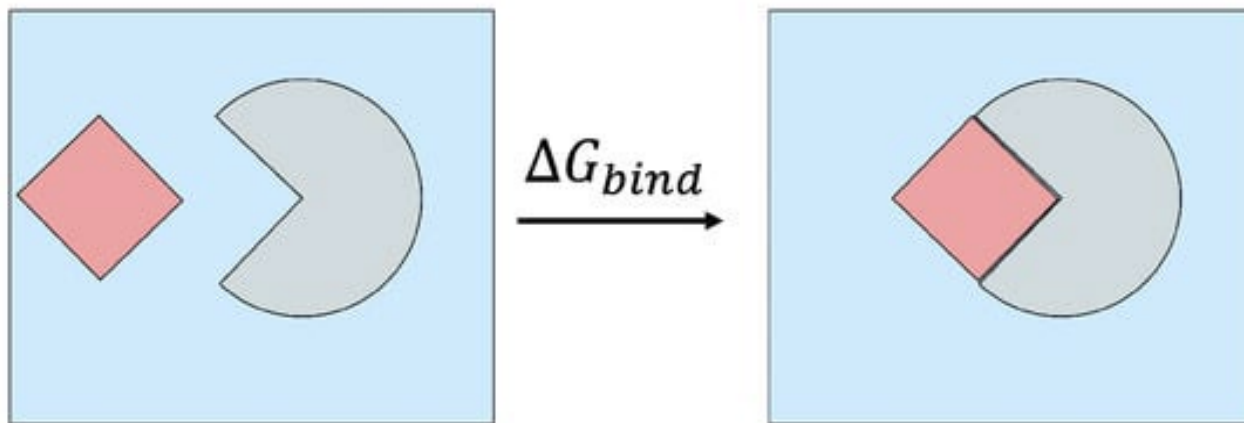
Οι εξισώσεις λύνονται για όλα τα σωματίδια που απαρτίζουν το σύστημα ταυτόχρονα, θεωρώντας μικρά χρονικά διαστήματα  $dt$ . Η επιλογή του χρονικού διαστήματος πρέπει να είναι τέτοια ώστε να μπορεί να μετρηθεί και η πιο γρήγορη διαδικασία του συστήματος που μας ενδιαφέρει, όπως είναι συνήθως η δόνηση του δεσμού που περιλαμβάνει υδρογόνο. Γι' αυτόν τον λόγο, επιλέγονται μικρά χρονικά «βήματα» επίλυσης των εξισώσεων, της τάξης των  $1-2fs$ . Έπειτα από κάποιες αρχικές μεταβολές, το σύστημα θα φτάσει σε μια κατάσταση ισορροπίας (ένα τοπικό ελάχιστο στην επιφάνεια δυναμικής ενέργειας), όπου δεν θα λαμβάνει χώρα καμία αλλαγή.

Οι εξισώσεις λύνονται για όλα τα σωματίδια που απαρτίζουν το σύστημα ταυτόχρονα, θεωρώντας μικρά χρονικά διαστήματα  $dt$ . Η επιλογή του χρονικού διαστήματος πρέπει να είναι τέτοια ώστε να μπορεί να μετρηθεί και η πιο γρήγορη διαδικασία του συστήματος που μας ενδιαφέρει, όπως είναι συνήθως η δόνηση του δεσμού που περιλαμβάνει υδρογόνο. Γι' αυτόν τον λόγο, επιλέγονται μικρά χρονικά «βήματα» επίλυσης των εξισώσεων, της τάξης των  $1-2fs$ . Έπειτα από κάποιες αρχικές μεταβολές, το σύστημα θα φτάσει σε μια κατάσταση ισορροπίας (ένα τοπικό ελάχιστο στην επιφάνεια δυναμικής ενέργειας), όπου δεν θα λαμβάνει χώρα καμία αλλαγή (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9: Η Μοριακή Δυναμική έλαβε τεράστια ανάπτυξη. Η ευκινήσια των πρωτεϊνών όπως δείχεται στην εικόνα είναι ένα παράδειγμα. Πολυπλοκότερα συστήματα έχουν ακόμη αναπτυχθεί όπου μελετώνται μηχανισμοί δράσης φαρμακευτικών σε κέντρα δράσης.

Αναπτύχθηκαν διάφορες μέθοδοι καταμέτρησης της ελεύθερης ενέργειας των μορίων σε ένα διαλυτοποιημένο σύστημα όπως θα εξετάσουμε στα πειραματικά αποτελέσματα (π.χ.

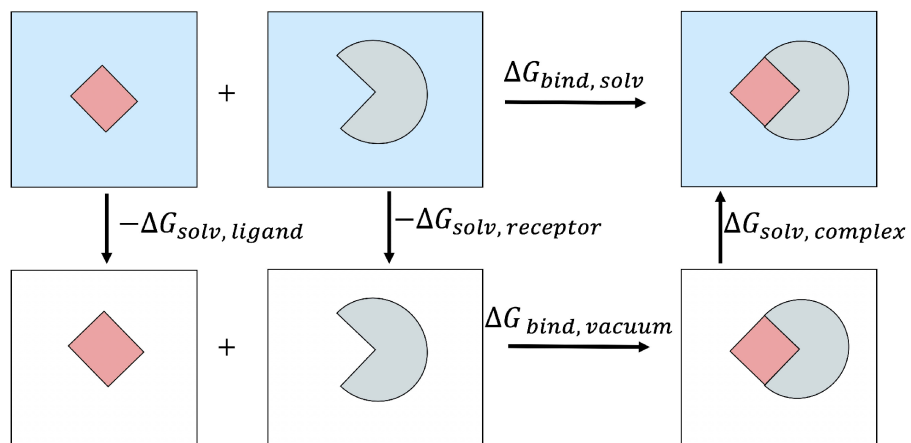


Εικόνα 1.10: Υπολογισμός  $\Delta G$  πρόσδεσης MM/GBSA ή molecular mechanics/generalized Born and surface area continuum solvation).

Η ενέργεια πρόσδεσης υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση 1:3:

$$\Delta G_{\text{πρόσδεσης}} = E_{\text{συμπλόκου (ελαχιστοποιημένο)}} - E_{\text{προσδέτη (ελαχιστοποιημένο)}} - E_{\text{υποδοχέα (ελαχιστοποιημένο)}} \quad (1:3)$$

Συνήθως χρησιμοποιείται ο παρακάτω θερμοδυναμικός κύκλος και η εξίσωση 1:4



Εικόνα 1.11: Θερμοδυναμικός κύκλος πρόσδεσης

$$\Delta G_{bind,solv} = \Delta G_{bind,vacuum} + \Delta G_{solv,complex} - (\Delta G_{solv,ligand} + \Delta G_{solv,receptor}) \quad (1.4)$$

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

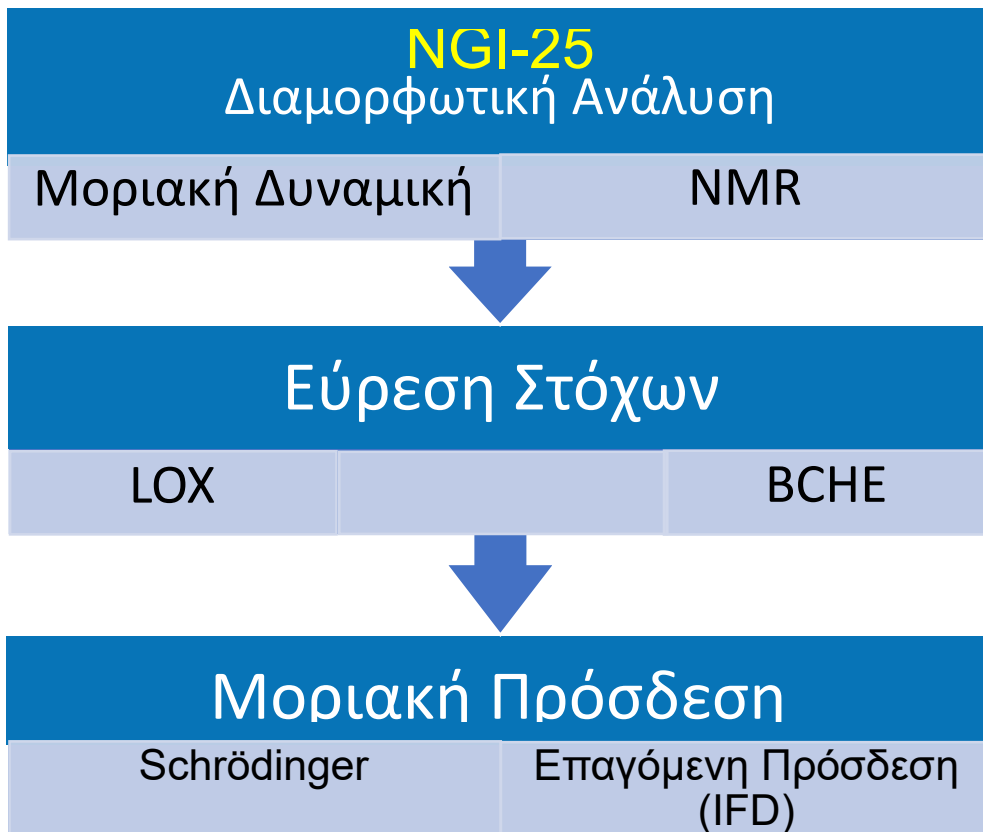
### Αντικειμενικοί Στόχοι της Μεταπτυχιακής Εργασίας

Οι αντικειμενικοί στόχοι της μεταπτυχιακής εργασίας είναι δύο:

Κατά πρώτον να μελετηθεί η διαμορφωτική ανάλυση του μορίου NG125, που συντέθηκε στο εργαστήριο της Καθηγήτριας Σ. Βασιλείου, με χρήση συνδυασμού Μοριακής Δυναμικής και Φασματοσκοπίας NMR.

Κατά δεύτερον να μελετηθούν πιθανοί στόχοι του μορίου όπως είναι οι λιποξυγονάσες και βουτυλοχοληστεράση με χρήση της Μοριακής Πρόσδεσης.

Οι στόχοι αυτοί παραστατικά αποδίδονται στο παρακάτω σχήμα.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

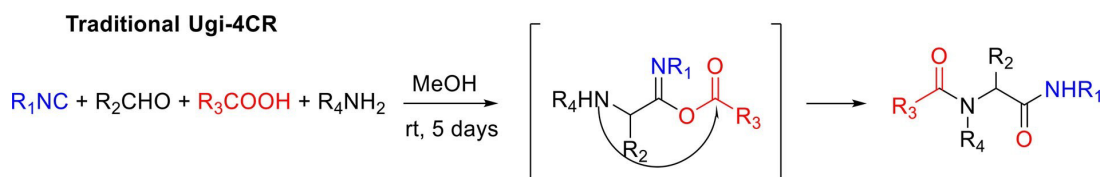
### Υλικά και Μέθοδοι

#### 3.1 Εισαγωγή

Οι πολυσυνθετικές αντιδράσεις (MCR) ορίζονται ευρέως ως αντιδράσεις (MCRs), στις οποίες τρία ή περισσότερα συστατικά προστίθενται ταυτόχρονα σε ένα μόνο δοχείο, με αποτέλεσμα να παρασκευασθεί ένα τελικό προϊόν που περιέχει τα περισσότερα από τα άτομα των αρχικών αντιδραστηρίων [100]. Στο βαθμό που πληρούν πολλά από τα κριτήρια που ορίζει η πράσινη χημεία, αυτή η βιώσιμη στρατηγική έχει βρει πολλές εφαρμογές, από την παραγωγή χημικών προϊόντων υψηλής καθαρότητας έως διάφορες χρήσεις στις επιστήμες των υλικών [101-106].

Οι πολυσυνθετικές αντιδράσεις με βάση ισοκυανίδια (IMCR) είναι αποτελεσματικές και απλές μέθοδοι για την πρόσβαση σε πολύτιμα μόρια [107,108]. Από τότε που οι Passerini και Ugi απέδειξαν ότι η αμφίροπη δραστηριότητα των ισοκυανιδίων μπορούσε να αξιοποιηθεί με επιτυχία σε πολυσυνθετικές διεργασίες, αυτή η μεθοδολογία δεν έπαψε ποτέ να παρέχει πρόσβαση σε πολύτιμα μόρια που έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην ανακάλυψη φαρμάκων [107], στη σύνθεση φυσικών προϊόντων [109], στη βιολογία [110] και στην επιστήμη των υλικών [111].

Ως μία από τις πιο γνωστές IMCR, η κλασική Ugi-4CR [112] που χρησιμοποιεί ισοκυανίδια, αλδεΐδες, αμίνες και καρβοξυλικά οξέα (Σχήμα 3.1) είναι ένα ισχυρό εργαλείο για τη σύνθεση πεπτοειδών. Αυτή η αντίδραση χρησιμεύει ως ένα ιδανικό εργαλείο για την πρόσβαση σε μεγάλο και ποικίλο χημικό χώρο, δημιουργώντας έως και πέντε σημεία δομικής ποικιλομορφίας σε ένα δοχείο, το οποίο μπορεί να είναι πολύ χρήσιμο για την ταχεία σύνθεση βιοδραστικών μορίων [113].



**Σχήμα 3.1:** Παραδοσιακή αντίδραση Ugi-4CR. Για τη σύνθεση του NGI25 R1 = κυκλοεξυλο, R2 = H, R3 = παράγωγο κινναμικού, R4 = Bn

Η αντίδραση Ugi-4CR χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του μορίου που μελετάται, N-βενζυλ-N-(2-(κυκλο-εξυλαμινο)-2-οξοαιθυλο) κινναμαμίδιο, ή η συντομογραφία του NGI25.

Πραγματοποιήθηκε λεπτομερής ανάλυση της διαμόρφωσης του NGI25 με πολλαπλές μεθόδους, προκειμένου να προσδιοριστεί η πιο ενεργειακά ευνοϊκή διαμόρφωση. Συγκεκριμένα, έχουν εφαρμοστεί NMR, μοριακή μηχανική (μέσω εξονυχιστικής ανάλυσης-grid scan), MD, ημι-εμπειρική μέθοδος PM6 και μεθοδολογία DFT σε διαλύτες χλωροφόρμιο (CHCl<sub>3</sub>) και διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Έχει εξεταστεί ένα ευρύ φάσμα διαμορφώσεων μέσω υπολογισμών PM6 και DFT. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν υπολογισμοί μοριακής δυναμικής για τη μελέτη της κινητικότητας του NGI25 στους δύο διαλύτες DMSO και CHCl<sub>3</sub>. Δεδομένου ότι το παράγωγο του κινναμικού οξέος, NGI25, είναι μια νέα δομή, αναζητήθηκαν πιθανοί φαρμακολογικοί στόχοι μέσω του Swiss Target module. Προκειμένου να δικαιολογηθεί η πρόσδεση του NGI25 με τους προβλεπόμενους πιθανούς φαρμακολογικούς στόχους, πραγματοποιήσαμε υπολογισμούς μοριακής πρόσδεσης στους προβλεπόμενους ενζυμικούς στόχους. Δύο κύριοι στόχοι ανιχνεύθηκαν χρησιμοποιώντας το Swiss Target module και δεδομένα από τη βιβλιογραφία.

Έτσι, το NGI25 εξετάστηκε μέσω μελετών μοριακής πρόσδεσης (Molecular Docking) για την πιθανή αναστολή της λιποξυγονάσης (LOX) και τη δράση του κατά της βουτυρυλοχολινεστεράσης (anti-BCHE) για τη θεραπεία της νόσου του Alzheimer. Τα αποτελέσματα της μοριακής πρόσδεσης δείχνουν ότι το NGI25 προσδένεται ισχυρά με τα ενεργά κέντρα και των δύο ενζύμων, ενώ η τιμή  $\Delta G_{\text{bind}}$  του NGI25 είναι πιο ευνοϊκή σε σύγκριση με την τιμή  $\Delta G_{\text{bind}}$  γνωστών αναστολέων LOX και BCHE. Η *in silico* εξέταση των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων του μορίου δείχνει ότι δεν ασκεί καμία τοξική δράση, όπως προβλέπεται από το SwissADME module [114].

## 3.2 Σύνθεση του NGI25

$\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-d}_6$  και σωληνίσκοι NMR εξαιρετικής ακρίβειας Wilmard 535–5 mm (SPINTEC ROTOTEC) χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα NMR Το NGI25 συντέθηκε στο εργαστήριό μας, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Ένα διάλυμα βενζυλαμίνης (0,11 mL, 1,00 mmol), παραφορμαλδεΐδης (0,03 g, 1,00 mmol) σε MeOH (6 mL) αναδεύτηκε για 5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια προστέθηκαν κινναμικό οξύ (0,15 g, 1,00 mmol) και κυκλοεξυλοϊσοκυανίδιο (0,12 mL, 1,00 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 ημέρες. Τα πτητικά συστατικά απομακρύνθηκαν και το ακατέργαστο προϊόν καθαρίστηκε με στήλη χρωματογραφίας χρησιμοποιώντας οξικό αιθυλεστέρα και πετρελαϊκό αιθέρα ως εκχυλιστικά μέσα, ώστε να ληφθεί το επιθυμητό προϊόν ως λευκή στερεά ουσία με απόδοση 86%.  $R_f=0,54$  [AcOEt/PE (40–60 °C) 2:3].

## 3.3 Διαμορφωτική ανάλυση

### 3.3.1 Φασματοσκοπία NMR

Τα φάσματα NMR σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  ελήφθησαν χρησιμοποιώντας φασματογράφο Bruker Avance 400 MHz στους 25 °C. Όλα τα δεδομένα συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας ακολουθίες παλμών και ρουτίνες κύκλου φάσης που παρέχονται στις βιβλιοθήκες προγραμμάτων παλμών Bruker ( $^1\text{H}$ : zg30,  $^{13}\text{C}$ : zgpg30, 2D COSY: cosygpmfzf, 2D NOESY: noesygrrhrr, 2D HSQC: hsqcedetgpsisp [101,102]. 2D HMBC: hmbclpndzf). Η επεξεργασία των δεδομένων, συμπεριλαμβανομένης της συνάρτησης sinebell, του μετασχηματισμού Fourier, της συμμετρίας φάσης και τη γραφική παράσταση πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του πακέτου λογισμικού Bruker και MestreNova.

### 3.3.2 Σάρωση πλέγματος

Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για τη σάρωση πλέγματος ήταν το Macromodel, το οποίο είναι διαθέσιμο στο Schrodinger Suites. Η μέθοδος ελαχιστοποίησης ενέργειας και σάρωσης πλέγματος πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πεδίο δυνάμεων (force field) OPLS2005.

### 3.3.3 Μοριακή δυναμική

Το σύστημα για τις μελέτες MD [115] ρυθμίστηκε με μόρια DMSO ή χλωροφόρμιο που περιβάλλουν την κινναμική ένωση. Εφαρμόστηκε το πεδίο δυνάμεων OPLS2005 και οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις μακράς εμβέλειας αντιμετωπίστηκαν με τη μέθοδο Ewald (PME) [116,117] και απόσταση πλέγματος 0,8 Å. Οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μικρής εμβέλειας αποκόπηκαν ομαλά στα 9,0 Å. Η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή χρησιμοποιώντας τον θερμοστάτη Nose-Hoover [118], ενώ η μέθοδος Martyna-Tobias-Klein [117] χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της πίεσης. Περιοδικές οριακές συνθήκες εφαρμόστηκαν και οι διαστάσεις του πλαισίου προσομοίωσης ήταν (10,0 × 10,0 × 10,0) Å. Οι εξισώσεις κίνησης ενσωματώθηκαν χρησιμοποιώντας τον πολυβηματικό ολοκληρωτή RESPA (multistep RESPA) [119] με εσωτερικό βήμα χρόνου 2 fs για δεσμευμένες αλληλεπιδράσεις και μη δεσμευμένες αλληλεπιδράσεις εντός ενός ορίου 9 Å. Ένα εξωτερικό χρονικό βήμα 6 fs χρησιμοποιήθηκε για μη δεσμευμένες αλληλεπιδράσεις πέραν του ορίου. Κάθε σύστημα εξισορροπήθηκε χρησιμοποιώντας το προεπιλεγμένο πρωτόκολλο που παρέχεται στο Desmond [120]. Το πρωτόκολλο εφησυχασμού του Desmond περιλαμβάνει ελαχιστοποίηση του συστήματος πρώτα με περιορισμό της διαλυμένης ουσίας και στη συνέχεια χωρίς περιορισμούς. Το σύστημα εφησύχασε στο σύνολο NVT (NVT ensemble) χρησιμοποιώντας θερμοστάτη Berendesen με γρήγορη σταθερά θερμοκρασίας εφησυχασμού (fast temperature relaxation constant) σε  $T = 10$  K για 1,0 ns, ενώ η ταχύτητα επαναδειγματολειτουργίας (velocity resampling) ορίστηκε σε 1 ps. Ο θερμοστάτης Berendesen και ο βαροστάτης Berendesen χρησιμοποιήθηκαν για τη χαλάρωση του συστήματος στο σύνολο NPT (NPT ensemble) χρησιμοποιώντας θερμοκρασία 10 K με γρήγορη και αργή σταθερά πίεσης εφησυχασμού (fast and slow constant relaxation pressure) ενώ η πίεση του συστήματος ορίστηκε σε 1 atm για 12 ps. Ο ίδιος θερμοστάτης και βαρόμετρο χρησιμοποιήθηκαν για την ακόλουθη προσομοίωση 24 ps, όπου το σύστημα αφέθηκε να χαλαρώσει σε  $T = 298$  K και  $P = 1$  atm. Πριν από την έναρξη της φάσης παραγωγής, το σύστημα αφέθηκε να χαλαρώσει στο σύνολο NPT χωρίς περιορισμούς για 1,0 ns. Η φάση παραγωγής της προσομοίωσης MD ορίστηκε σε 500 ns. Οι προσομοιώσεις MD εκτελέστηκαν σε σταθμούς εργασίας (workstations) χρησιμοποιώντας τις εφαρμογές των κωδίκων προσομοίωσης MD σε κάρτες γραφικών (GPU implementation of the MD simulation

codes). Ο χρόνος εξισορρόπησης απορρίφθηκε και μόνο η φάση παραγωγής δειγματολογήθηκε για να εξασφαλιστεί επαρκή δειγματοληψία

Οι ίδιες παράμετροι για τις μελέτες MD έχουν εφαρμοστεί για τις προσομοιώσεις των συμπλοκών «ενζύμου-προσδέτη». Σε αυτές τις προσομοιώσεις, τα σύμπλοκα διαλύθηκαν με μοντέλα νερού TIP3P, ενώ η πίεση ορίστηκε σε 1 atm και η θερμοκρασία σε 310 K, προκειμένου να μελετηθεί η σταθερότητα των προσδετών στις κοιλότητες των ενζύμων. Η φάση παραγωγής αυτών των προσομοιώσεων ορίστηκε σε 200 ns, που είναι ένας επαρκής υπολογιστικός χρόνος για την παρατήρηση ενός συμπλόκου «πρωτεΐνης-προσδέτη».

### 3.3.4 Ημι-εμπειρικοί υπολογισμοί και υπολογισμοί DFT

Τέλος, εκτός από τη διαμόρφωτική ανάλυση μέσω μοριακής μηχανικής, πραγματοποιήθηκε επίσης διαμόρφωτική ανάλυση μέσω της ημιαμπειρικής μεθόδου PM6 και της μεθόδου DFT (B3LYP [121,122]/6-311 + G(d,p) [123]). Πλήρης βελτιστοποίηση της γεωμετρίας των δυνητικά σταθερών δομών πραγματοποιήθηκε και στα δύο επίπεδα της θεωρίας σε DMSO και σε διαλύτες χλωροφόρμιο χρησιμοποιώντας το «συνεχές πολώσιμο» μοντέλο (polarizable continuum model) (PCM) [124]. Για να διασφαλιστεί ότι αυτή η δομή είναι ένα πραγματικό ενεργειακό ελάχιστο, υπολογίστηκαν οι συχνότητές της. Δεν βρέθηκαν φανταστικές συχνότητες, επιβεβαιώνοντας ότι πρόκειται για πραγματική δομή ελάχιστου. Έτσι, υπολογίστηκε το ολικό ελάχιστο. Όλοι οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν και απεικονίστηκαν χρησιμοποιώντας το Gaussian 16 [125].

### 3.4 Επαγόμενη προσαρμογή

Στο επόμενο στάδιο, το NGI25 ερευνήθηκε για την ισχυρή του πρόσδεση με δύο σημαντικούς στόχους που αποκαλύφθηκαν από το εργαλείο Swiss Target (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) και τη βιβλιογραφία [126,127] μέσω υπολογισμών μοριακής σύνδεσης. Οι κρυσταλλικές δομές που χρησιμοποιήθηκαν για τις *in silico* μελέτες είχαν τις ακόλουθες PDB IDs: 5T5V [128] και 4BDS [129]. Ο οδηγός προετοιμασίας πρωτεϊνών (Protein preparation wizard), η ενότητα (module) διαθέσιμη στο Schrodinger Suites, χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία της κρυσταλλικής δομής για τους *in silico* υπολογισμούς. Για να ληφθούν υπόψη τα κβαντικά φαινόμενα που σχετίζονται με την παρουσία ενός κατιόντος Fe<sup>3+</sup> στο ενεργό κέντρο του LOX, χρησιμοποιήσαμε τη λειτουργική

μονάδα «δημιουργία δεσμών μηδενικής τάξης με μέταλλα» της πλατφόρμας μοριακής μοντελοποίησης Schrodinger's Maestro. Αυτή η ενότητα διακόπτει τους υπάρχοντες δεσμούς με μέταλλα -δεδομένου ότι δεν μπορούν να εξεταστούν μέσω του υπερβολικά απλοποιημένου μοντέλου ενός ελατηρίου συνδεδεμένου με μια σκληρή σφαίρα-, προσθέτει νέους δεσμούς μηδενικής τάξης μεταξύ μετάλλων και γειτονικών ατόμων και διορθώνει ανάλογα τα τυπικά τους φορτία, προκειμένου να περιορίσει τη γεωμετρία συντονισμού που αποκτήθηκε με ακτίνες X.

Το κινναμικό παράγωγο δομήθηκε (sketched) στην πλατφόρμα μοριακής μοντελοποίησης Maestro της Schrodinger [130] και αρχικά ελαχιστοποιήθηκε χρησιμοποιώντας υπολογισμούς MacroModel [131] και DFT. Το LigPrep χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία των τρισδιάστατων μοντέλων, περιοριζόμενο στη συγκεκριμένη στερεοχημεία κάθε μορίου. Κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας του προσδέτη, επιλέχθηκε η επιλογή «add metal binding states» (προσθήκη καταστάσεων σύνδεσης μετάλλου) της ενότητας (module) Erik του LigPrep, προκειμένου να δημιουργηθούν καταστάσεις σύνδεσης προσδέτη που είναι κατάλληλες για σύνδεση μετάλλου, οι οποίες διαφορετικά θα είχαν απορριφθεί λόγω των υψηλών ποινών ενεργειακής κατάστασης. Οι γεωμετρίες βελτιστοποιήθηκαν με το MacroModel, προκειμένου να χαλαρώσουν οι δομές, ενώ τα χειρόμορφα κέντρα διατήρησαν τις κατάλληλες χειρόμορφες ιδιότητες. Το πεδίο δυνάμεων που χρησιμοποιήθηκε για την ελαχιστοποίηση ήταν το OPLS2005 [132]. Το NGI25 υποβλήθηκε σε κατάλληλη επεξεργασία των καταστάσεων πρωτονίωσης σε φυσιολογικό pH (~7,4). Οι μέθοδοι Hammett και Taft έχουν εφαρμοστεί σε συνδυασμό με ένα εργαλείο ιονισμού για τη δημιουργία χημικά ευαίσθητων τρισδιάστατων μοντέλων. Η τρισδιάστατη δομή των προσδετών ελαχιστοποιήθηκε περαιτέρω, με μεγαλύτερη ακρίβεια, από το MacroModel με νερό ως διαλύτη και OPLS2005 ως πεδίο δυνάμεων, χρησιμοποιώντας μια μέθοδο που χρησιμοποιεί συζευγμένες βαθμίδες (conjugate gradient method) (CG) με όριο 0,01 kcal/mol. Η ελαχιστοποιημένη δομή χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω ως είσοδος σε μια μικτή αναζήτηση διαμόρφωσης στρέψης/χαμηλής δειγματοληψίας που αναγκάστηκε να διατηρήσει τις χειρόμορφες ιδιότητες της εισόδου. Η αναζήτηση διαμόρφωσης παρήγαγε έναν αριθμό διαμορφωτών για κάθε μόριο υπό μελέτη και οι διαμορφωτές ταξινομήθηκαν ενεργειακά. Η

πιο ευνοϊκή διαμόρφωση χρησιμοποιήθηκε ως είσοδος για τους ακόλουθους υπολογισμούς πρόσδεσης.

Έχουν πραγματοποιηθεί υπολογισμοί πρόσδεσης για να αποκαλυφθεί η πιθανή σύνδεση του NGI25 με LOX-1 και BCHE. Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο Induced Fit Docking (IFD). Ο σύνδεσμος συνδέθηκε στις 10 ενεργειακά ευνοϊκές διαμορφώσεις που δημιουργήθηκαν από το MacroModel. Η περιορισμένη βελτίωση της προετοιμασίας της πρωτεΐνης εφαρμόστηκε στο στάδιο σύνδεσης Glide. Εφαρμόστηκε αυτόματη περικοπή των πλευρικών αλυσίδων με βάση τον παράγοντα B (B-factor) και βελτίωση Prime των πλευρικών αλυσίδων της πρωτεΐνης και η διαδικασία σύνδεσης ολοκληρώθηκε με Glide/XP. Τέλος, υπολογίστηκε η ενέργεια σύνδεσης για κάθε στόχο. Το ενεργό κέντρο περιγράφηκε χρησιμοποιώντας μια διηλεκτρική σταθερά 80 και όλα τα κρυσταλλογραφικά νερά του ενεργού κέντρου διατηρήθηκαν.

Η ίδια διαδικασία εφαρμόστηκε για δύο γνωστούς αναστολείς αυτών των ενζύμων, τα οποία ανακτήθηκαν από τη βιβλιογραφία προκειμένου να χρησιμεύσουν ως πρότυπα μόρια για την αξιολόγηση της δράσης του NGI έναντι των ενζύμων. Οι δύο αναστολείς είναι το zileuton [133] για το LOX και η ριβαστιγμίνη για το BCHE [134].

### **3.5 Μοριακή μηχανική/γενικευμένη επιφάνεια Born (MM/GBSA)**

Το MM/GBSA χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση της σταθερότητας των συμπλοκών πρωτεΐνης-ligand, μέσω του υπολογισμού της ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης. Οι εξισώσεις MM/GBSA επεκτάθηκαν σε σύνθετες δομές χρησιμοποιώντας το Prime module του Maestro. Τα τρία στατιστικά κυρίαρχα σύμπλοκα ligand-πρωτεΐνης που προέκυψαν από την ανάλυση συστάδων τροχιάς MD υποβλήθηκαν σε υπολογισμούς MM/GBSA. Το μοντέλο διαλυτοποίησης VSGB, το οποίο είναι μια ρεαλιστική παραμετροποίηση της διαλυτοποίησης, και το πεδίο δυνάμεων OPLS-2005 χρησιμοποιήθηκαν για την ευκαμψία της πρωτεΐνης [135].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### Αποτελέσματα και συζήτηση

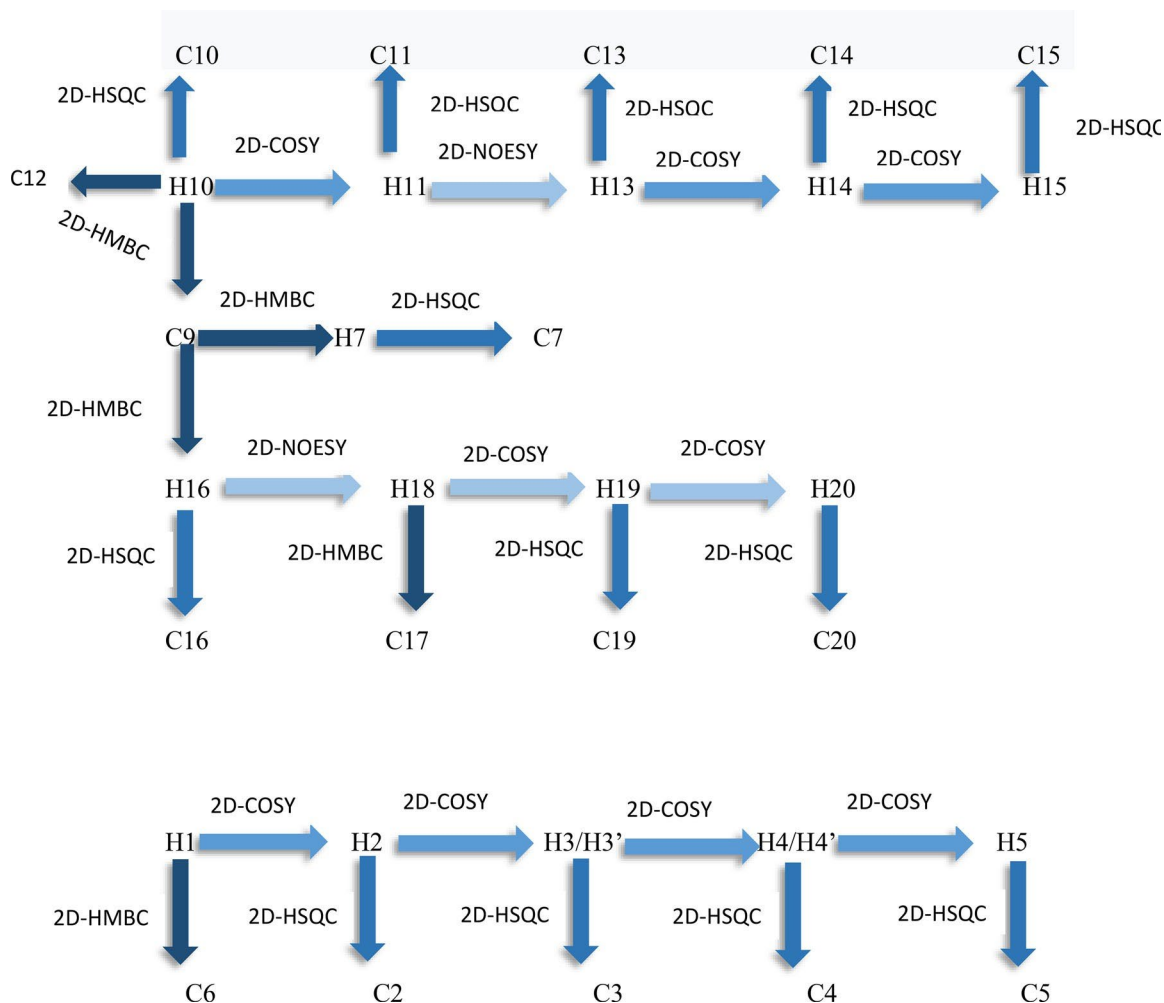
#### 4.1 Σύνθεση του NGI-25

Η σύνθεση του μελετηθέντος Ugi-4CR NGI25 συνοψίζεται στο Σχήμα 4.1. Χρησιμοποιώντας κινναμικό οξύ, βενζυλαμίνη, φορμαλδεΰδη και κυκλοεξυλο ισοκυανίδιο σε μεθανόλη σε θερμοκρασία δωματίου, αυτή η πειραματικά απλή, οικονομική σε άτομα και ευέλικτη πολυσυνθετική αντίδραση παρείχε, μετά από χρωματογραφικό καθαρισμό, το πρόσθετο Ugi.

#### 4.2 Στρατηγική που εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό της δομής του NGI25 σε DMSO

Ως εναρκτήριο σημείο εκκίνησης για τον προσδιορισμό της δομής του NGI25 χρησιμοποιήθηκε το εύκολα προσδιορίσιμο στο  $^1\text{H}$  NMR φασματικό, H-10. Αυτό συντονίζεται στα 7,08 ppm, όπως είναι εύκολα αναγνωρίσιμο από την ολοκλήρωσή του και τη διπλή κορυφή λόγω της σύζευξής του με το H-11. Το H-11 μπορεί να αναγνωριστεί εύκολα επειδή συντονίζεται στα 7,54 ppm μέσω 2D COSY, καθώς συσχετίζεται μέσω δεσμού με το H-10. Το H-11 είναι πιο αποθωρακισμένο από το H-10, όπως αναμενόταν, λόγω της σύζευξής του με τον διπλό δεσμό. Το H-11 συσχετίζεται με δύο H-10, υποδεικνύοντας ότι συμμετέχει σε δύο διαμορφώσεις. Μέσω 2D HSQC, τα H-10 και H-11 εμφανίζουν σύζευξη  $^1\text{J}_{\text{C-H}}$  με τα C-10 και C-11, αντίστοιχα, και επομένως τα C-10 και C-11 αποδίδονται χωρίς αμφιβολία στα 118,0 και 143,0 ppm, αντίστοιχα.

Μέσω του 2D NOESY, το H-13 αναγνωρίζεται στα 7,67 ppm λόγω της χωρικής συσχέτισής του με το H-11. Το H-14 και το H-15 αναγνωρίζονται στη συνέχεια μέσω του 2D COSY λόγω της συσχέτισής τους με το H-13 και το H-14, αντίστοιχα. Μέσω του 2D HSQC, το H-13, το H-14 και το H-15 δείχνουν ζεύγος  $^1\text{J}_{\text{C-H}}$  με τα C-13, C-14 και C-15, αντίστοιχα, και επομένως τα C-13, C-14 και C-15 αποδίδονται χωρίς αμφιβολία στα 128,0, 128,0 και 130,0 ppm αντίστοιχα.



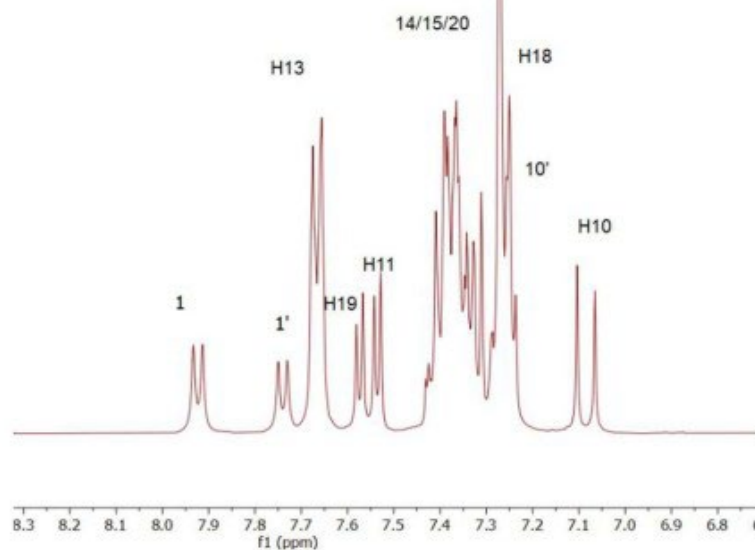
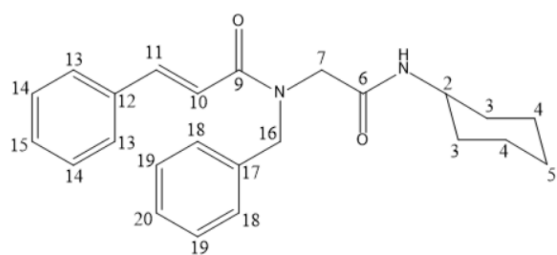
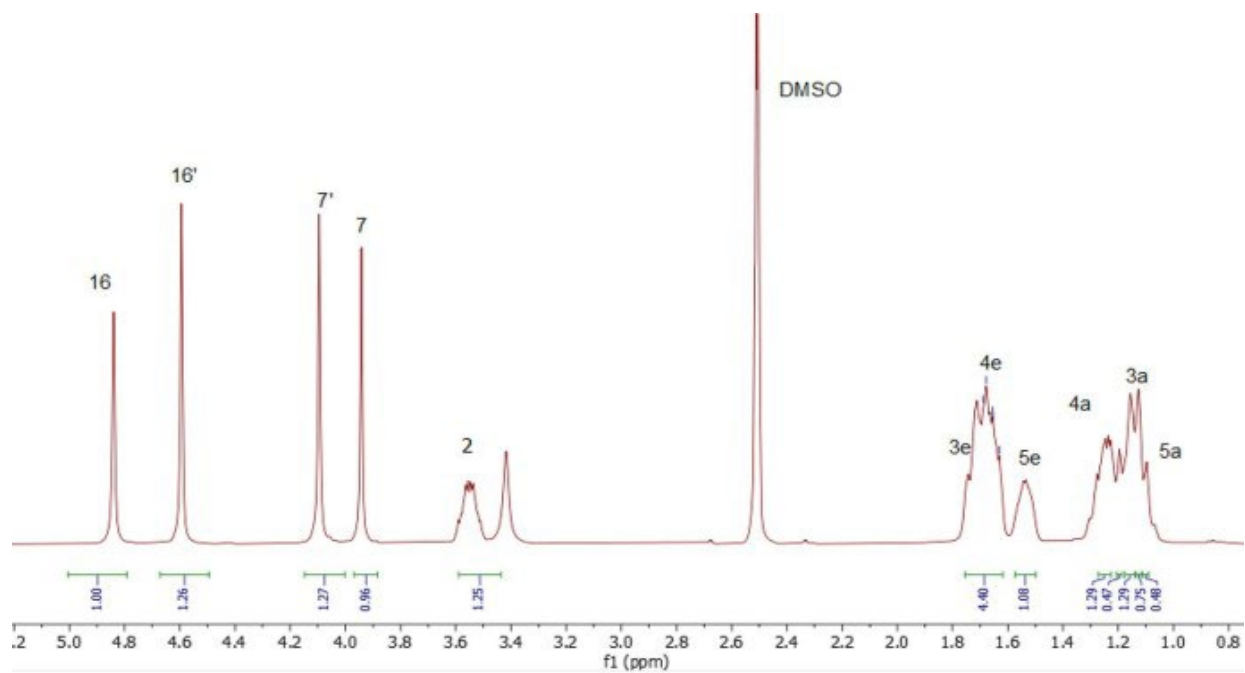
**Σχήμα 4.1:** Συνολικό διάγραμμα που δείχνει τη στρατηγική ταυτοποίησης της ένωσης NGI25 σε διαλύτες DMSO και CDCl<sub>3</sub>. Η ταυτοποίηση των κορυφών παρουσιάζεται στις εικόνες 4.1 και 4.2.

Η στρατηγική προχώρησε στην περιοχή 4–5 ppm των φασμάτων <sup>1</sup>H NMR. Μέσω 2D NOESY, παρατηρείται ότι οι κορυφές στα 4,60 και 4,85 ppm συσχετίζονται με το πρωτόνιο στα 7,25 ppm. Είναι εύκολο να κατανοηθεί ότι η τελευταία κορυφή οφείλεται στο H-18, καθώς συσχετίζεται μέσω του χώρου με το H-16. Μέσω του 2D COSY, τα H-19 και H-20 αναγνωρίζονται λόγω της συσχέτισής τους με το H-18 και το H-19, αντίστοιχα. Μέσω του 2D HSQC, τα H-18, H-19 και H-20 εμφανίζουν σύζευξη <sup>1</sup>J<sub>C-H</sub> με τα C-18, C-19 και C-20 αντίστοιχα και, ως εκ τούτου, τα C-18, C-19 και C-20 αποδίδονται χωρίς αμφιβολία στα 127,6, 128,0 και 126,0 ppm, αντίστοιχα. Η στρατηγική προχώρησε με τη μελέτη της αλειφατικής

περιοχής. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το H-16 αναγνωρίζεται εύκολα επειδή συντονίζεται στα 4,60 και 4,85 ppm, λόγω της συσχέτισής του με το H-18. Το H-7 συντονίζεται στα 3,95 και 4,10 ppm. Παρατηρούνται δύο κορυφές, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα πρωτόνια 16 και 7 μπορούν να υπάρχουν σε δύο διαμορφώσεις. Μέσω 2D HSQC, το H-16 και το H-7 εμφανίζουν  $^1J_{C-H}$  σύζευξη με το C-16 και το C-7, αντίστοιχα, και επομένως το C-16 και το C-7 αποδίδονται χωρίς αμφιβολία στα 50,2/51,9 και 49,1/50,1 ppm, αντίστοιχα, λόγω δύο διαμορφώσεων.

Η κορυφή στα 3,54 ppm αντιστοιχεί στο H-2 λόγω της συσχέτισής της με δύο κορυφές διπλού ζεύγους στα 7,75 και 7,91 ppm, αντίστοιχα, μέσω 2D COSY. Αυτές οι κορυφές διπλού ζεύγους αντιστοιχούν σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις του NH-1, καθώς το H-2 δεν μπορεί να συσχετιστεί με κανένα άλλο πρωτόνιο στην συγκεκριμένη περιοχή του φάσματος. Μέσω 2D HSQC, το H-2 εμφανίζει σύζευξη  $^1J_{C-H}$  με το C-2 που συντονίζεται στα 48,0 ppm.

Η στρατηγική συνεχίστηκε με τη λήψη περισσότερων πληροφοριών από τη συχνότητα συντονισμού του H-2. Το κυκλοεξάνιο διαθέτει ισημερινά και αξονικά πρωτόνια. Στην περίπτωση όπου η ομάδα στο κυκλοεξάνιο είναι σε αξονική θέση υπάρχει μια αξονική αλληλεπίδραση μεταξύ αυτής της ομάδας και του C4. Αυτό απουσιάζει στη διαμόρφωση όπου η ομάδα είναι ισημερινή. Αυτή η αξονική αλληλεπίδραση είναι ένα παράδειγμα τάσης van der Waals, η οποία είναι αυτή που προκαλεί στην αξονική διαμόρφωση υψηλότερη ενέργεια. Οι χημικές μετατοπίσεις των ισημερινών και αξονικών πρωτονίων εξαρτώνται από τη διεδρική γωνία μεταξύ πρωτονίων και ατόμων άνθρακα. Ως αποτέλεσμα, τα ισημερινά πρωτόνια του συντονίζονται σε υψηλότερες τιμές χημικών μετατοπίσεων από τα αξονικά πρωτόνια [136, 137]. Τα H-3, H-4 και H-5 αναγνωρίστηκαν μέσω 2D COSY και 2D NOESY.

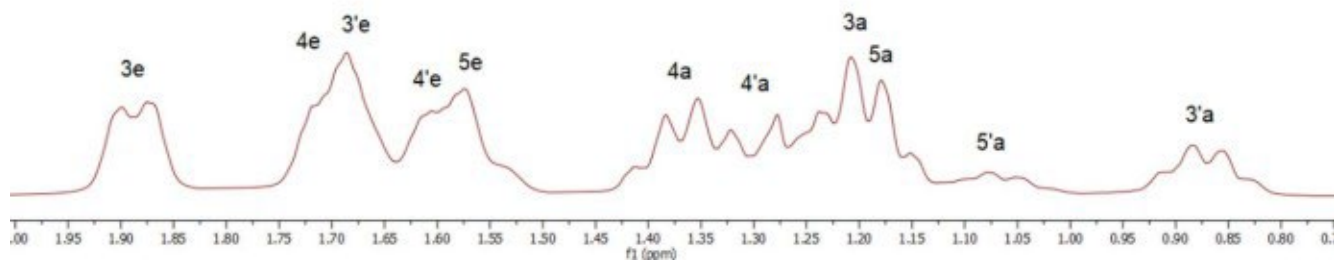
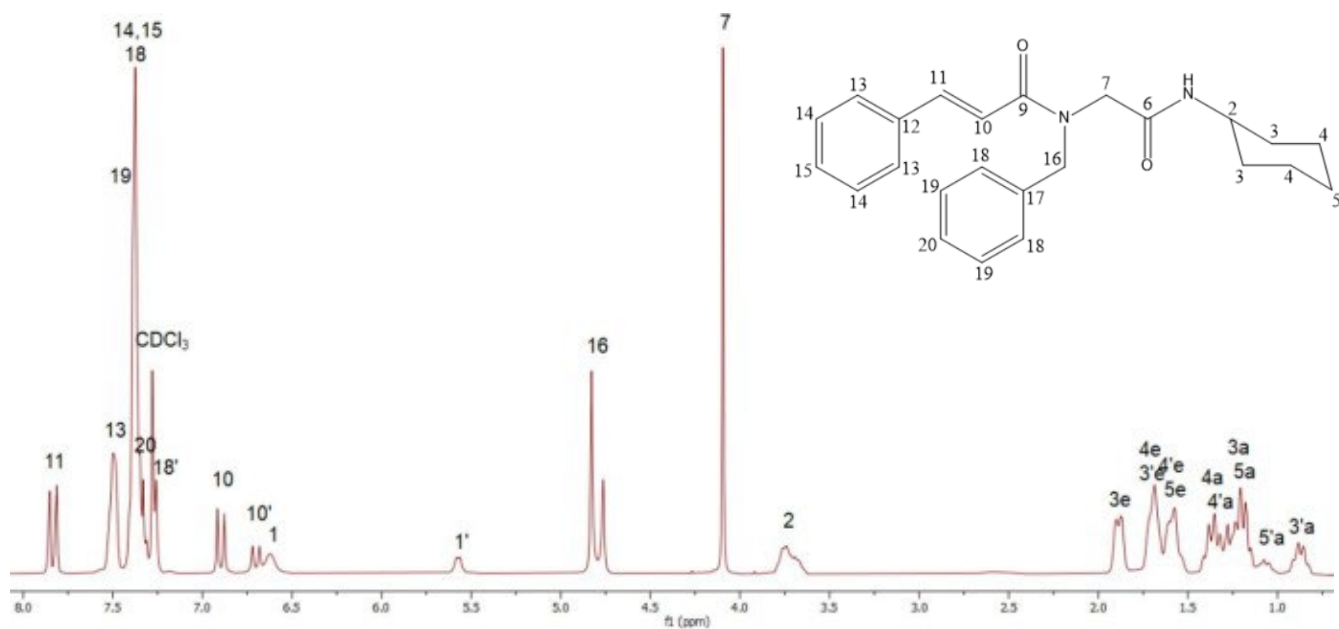


Εικόνα 4.12: Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR: (άνω) Αλειφατική περιοχή του NGI25 (κάτω) αρωματική περιοχή. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε DMSO- $d_6$  σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Συγκεκριμένα, η ευρεία κορυφή στα 1,54 ppm με ολοκλήρωση 1 οφείλεται στο H-5<sub>eq</sub>. Παρατηρείται επίσης ότι το H-2 συσχετίζεται με δύο πρωτόνια στα 1,75 και 1,14 ppm, τα οποία προφανώς αντιστοιχούν στο H-3<sub>eq</sub> και στο H-3<sub>ax</sub>, αντίστοιχα. Το H-4<sub>ax</sub> αναγνωρίζεται ότι συντονίζεται στα 1,25 ppm λόγω της συσχέτισής του με το H-3<sub>eq</sub>. Επιπλέον, το H-4<sub>eq</sub> αναγνωρίζεται ότι συντονίζεται στα 1,69 ppm λόγω της συσχέτισής του με το 3<sub>ax</sub>. Τα C-3, C-4 και C-5 προσδιορίστηκαν μέσω 2D HSQC.

Μέσω του διδιάστατου <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H φάσματος του NGI25, προσδιορίστηκαν όλοι οι άνθρακες εκτός από τους τεταρτοταγείς και τους καρβονυλικούς άνθρακες. Ωστόσο, αυτοί οι άνθρακες μπορούν να προσδιοριστούν μέσω 2D HMBC. Τα καρβονύλια συντονίζονται στα 160–200 ppm. Συγκεκριμένα, το H-10 εμφανίζει <sup>2</sup>J<sub>C-H</sub> σύζευξη με το C-9 και το H-1 εμφανίζει <sup>2</sup>J<sub>C-H</sub> σύζευξη με το C-6. Παρατηρείται ότι το C-6 είναι ελαφρώς πιο αποθωρακισμένο από το C-9 [138]. Συνεχίζοντας με την ταυτοποίηση των τεταρτοταγών ατόμων άνθρακα, στο φάσμα <sup>13</sup>C, παρατηρούνται δύο κορυφές στα 135,0 και 137,5 ppm, οι οποίες δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί. Αυτές θα οφείλονται στους άνθρακες 12 και 17, αντίστοιχα. Μέσω 2D HMBC, το H-10 εμφανίζει <sup>3</sup>J<sub>C-H</sub> σύζευξη με το C-12 και το H-18 εμφανίζει <sup>2</sup>J<sub>C-H</sub> σύνδεση με το C-17. Με βάση αυτή τη στρατηγική, επιτεύχθηκε η πλήρης ταυτοποίηση όλων των πρωτονίων και των ατόμων άνθρακα του μορίου NGI25 (βλ. τη στρατηγική Σχήμα 4.1).

Οι εικόνες 4.1 και 4.2 δείχνουν τις χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>H του NGI25 σε CDCl<sub>3</sub> και DMSO-d<sub>6</sub>, αντίστοιχα. Τα φάσματα 1D και 2D του NGI25 στα δύο περιβάλλοντα παρουσιάζονται στο Παράρτημα.



Εικόνα 4.13: Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR: (άνω) Πλήρης περιοχή (κάτω) αλειφατική περιοχή του NGI25. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε  $\text{CDCl}_3$  σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

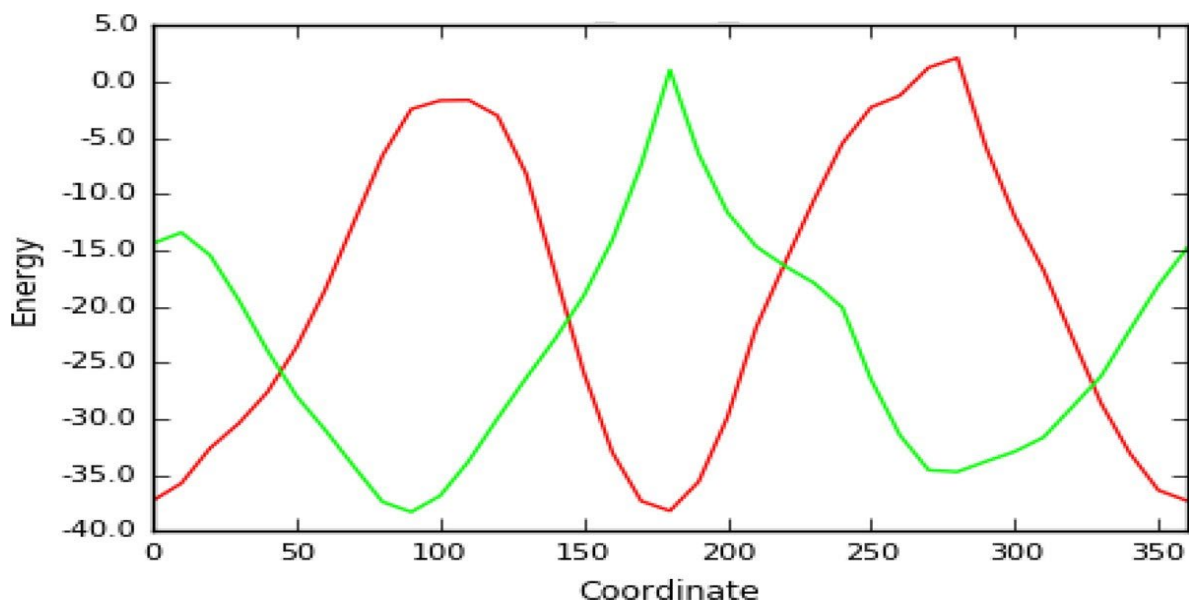
### 4.3 Σάρωση πλέγματος

Οι γωνίες του NGI25 που επιλέχθηκαν για την εφαρμογή της μεθοδολογίας Grid Scan σχηματίζονται από τα ακόλουθα άτομα: 7-8(N)-9-10 ( $\phi 1$ ) και από 6-7-8(N)-9 ( $\phi 2$ ). Οι κρίσιμες

διεδρικές γωνίες έχουν περιστραφεί προκειμένου να επιτευχθούν τα ελάχιστα και μέγιστα επίπεδα ενέργειας.

Μέσω της περιστροφής των  $\phi_1$  και  $\phi_2$  κατά  $10^\circ$ , λάβαμε τις χαμηλότερες διαμορφώσεις που απεικονίζονται όταν οι διεδρες γωνίες είναι  $180,3^\circ$  και  $89,9^\circ$ , αντίστοιχα (Εικόνα 4.3).

Η ελαχιστοποιημένη διαμόρφωση που αποκτήθηκε από την περιστροφή της διεδρης γωνίας  $\phi_1$  χρησιμοποιήθηκε ως αρχική δομή για την επόμενη σάρωση πλέγματος. Μια δεύτερη αναζήτηση σάρωσης πλέγματος πραγματοποιήθηκε από την περιστροφή της διεδρης γωνίας  $\phi_2$  και προέκυψε μια νέα ελαχιστοποιημένη δομή.



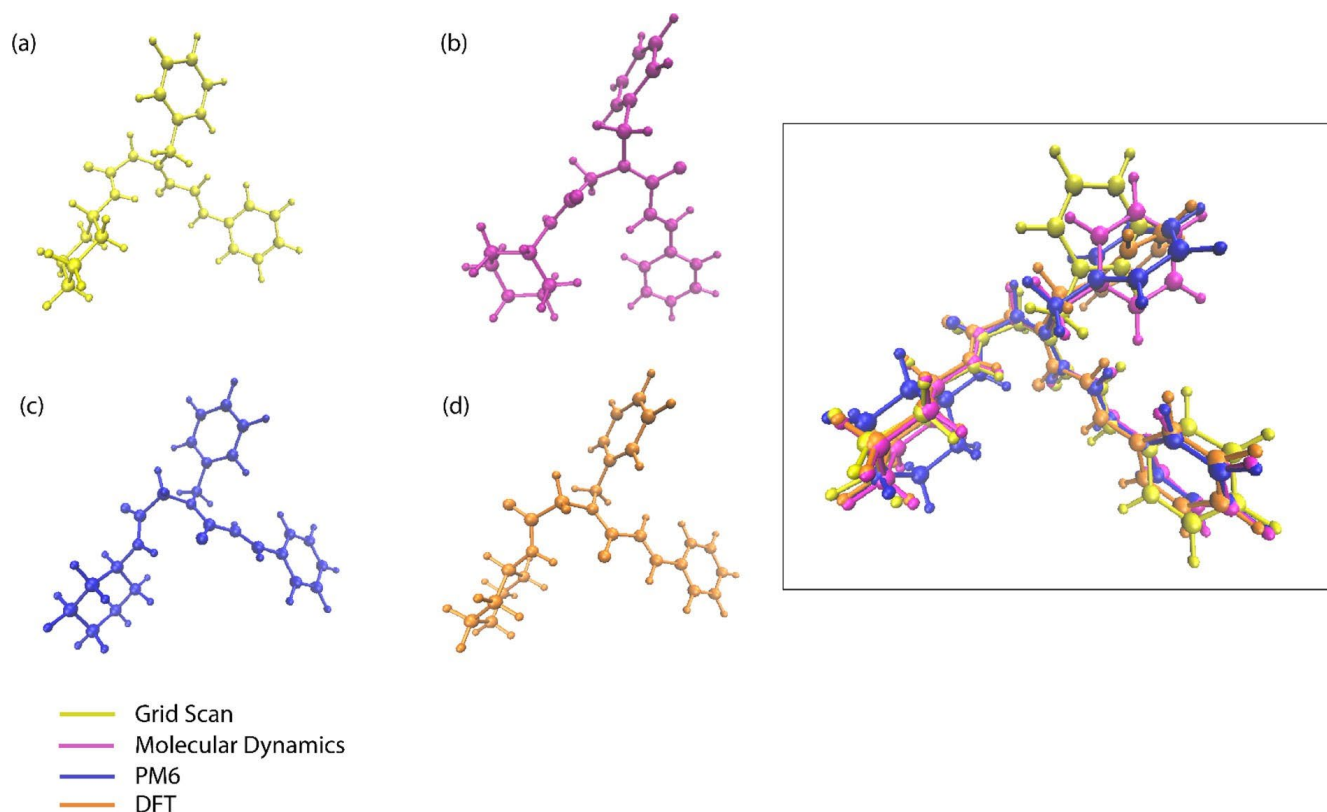
Εικόνα 4.14: Ενέργεια (kJ/mol) έναντι διεδρης γωνίας (συντεταγμένη). Η περιστροφή των γωνιών  $\phi_1$ ,  $\phi_2$  κατά  $10^\circ$  παράγει ένα ελάχιστο ενέργειας στα  $180,3^\circ$  (κόκκινη γραμμή) και  $89,9^\circ$  (πράσινη γραμμή) αντίστοιχα.

#### 4.4 Ανάλυση διαμόρφωσης με χρήση μοριακής δυναμικής

Η διαμόρφωση του NG125 που προέκυψε από τη σάρωση πλέγματος και ελαχιστοποιήθηκε χρησιμοποιήθηκε ως είσοδος για μελέτες μοριακής δυναμικής.

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση συστάδων τροχιάς για τα 500 ns των προσομοιώσεων. Η τροχιά χωρίστηκε σε 10 συστάδες με βάση τις διαμορφώσεις της κινναμικής ένωσης που υιοθετήθηκαν κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων. Η ανάλυση συστάδων μπορεί να

χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό διακριτών διαμορφώσεων σε αυτό το σύνολο, προσδιορίζοντας ομάδες διαμορφώσεων που παρουσιάζουν παρόμοιες γεωμετρίες σύμφωνα με μια επιλεγμένη μέτρηση. Η πιο πιθανή διαμόρφωση που υιοθετήθηκε για το 41% του χρόνου προσομοίωσης απεικονίζεται στο Εικόνα 4.5 (NGI25 σε DMSO). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και με διαλύτη χλωροφόρμιο. Μελέτες MD υποδηλώνουν ότι οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι της ένωσης είναι σχεδόν κάθετοι μεταξύ τους και στους δύο διαλύτες που δοκιμάστηκαν. Αυτό το αποτέλεσμα συμπληρώνει τα πειραματικά αποτελέσματα NMR, όπου δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις NOE μεταξύ των πρωτονίων των δύο αρωματικών δακτυλίων στο 2D NOESY φάσματος. Επιπλέον, η μεγάλη απόσταση του τμήματος κυκλοεξανίου της ένωσης από τους δύο αρωματικούς δακτυλίους συμφωνεί επίσης με τις μελέτες διαμόρφωσης NMR, καθώς δεν παρατηρήθηκαν NOE μεταξύ των πρωτονίων του κυκλοεξανίου και των αρωματικών πρωτονίων [139].



**Εικόνα 4.15:** Διαμόρφωση του NGI25 που προέρχεται από τις μεθοδολογίες (a) Grid scan (b) Molecular Dynamics (c) PM6 (d) DFT (B3LYP/6-311 + G(d,p)). Η επικάλυψη αυτών των διαμορφώσεων απεικονίζεται στο πλασιωμένο τμήμα της εικόνας.

#### 4.5 Ανάλυση διαμόρφωσης με ημιεμπειρικές και QM μεθόδους

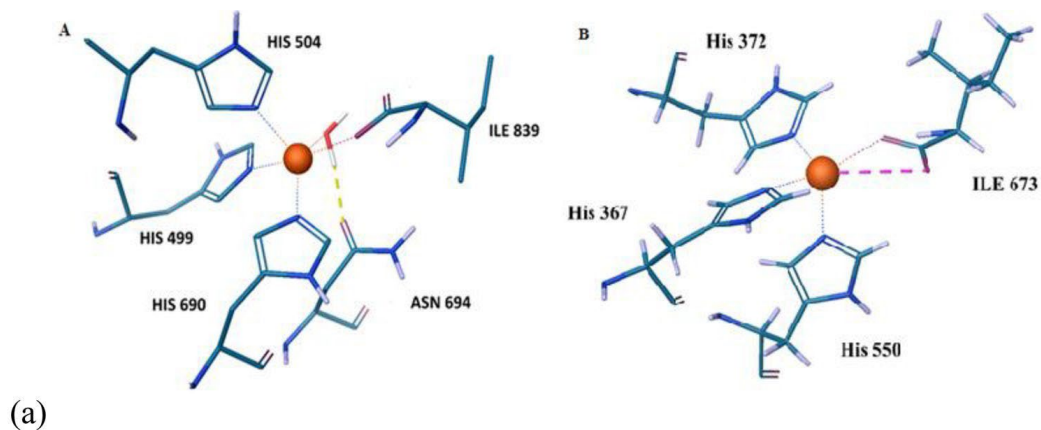
Η εικόνα 4.5 δείχνει όλες τις διαμορφώσεις που αποκτήθηκαν με την εφαρμογή διαφορετικών μεθόδων προκειμένου να ανακαλυφθούν οι διαμορφωτικές ιδιότητες του NGI25. Οι διαμορφώσεις του NGI δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων όλων των υπολογιστικών μεθόδων και των πειραματικών αποτελεσμάτων NMR.

Συγκεκριμένα, οι διαμορφώσεις που παρέχονται από τις μεθοδολογίες Grid Scan, MD, PM6 και DFT είναι αρκετά παρόμοιες (βλ. Εικόνα 4.4) και παρατηρούνται μόνο μικρές διαφορές μεταξύ των διαμορφώσεων που προέρχονται από τους υπολογισμούς PM6 και DFT. Οι μελέτες MD υποδηλώνουν μια αναστροφή 60° για έναν από τους αρωματικούς δακτυλίους, ενώ η ανίχνευση πλέγματος δείχνει ότι ο ίδιος δακτύλιος είναι ελαφρώς μετατοπισμένος σε σύγκριση με τις διαμορφώσεις DFT και PM6. Η επικάλυψη αυτών των διαμορφώσεων

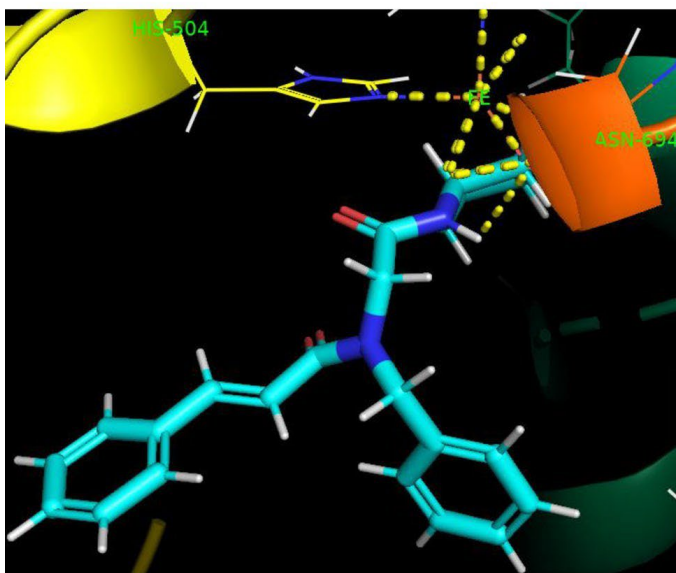
υποδεικνύει ότι δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές διαμόρφωσης μεταξύ τους. Όλες οι διαμορφώσεις που αποκαλύφθηκαν από τις υπολογιστικές μελέτες συμπληρώνουν τα πειραματικά αποτελέσματα. Στην πραγματικότητα, αυτές οι διαμορφώσεις υποδεικνύουν ότι οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι είναι σχεδόν κάθετοι μεταξύ τους, δικαιολογώντας την απουσία συσχετίσεων NOE στην αρωματική περιοχή στα φάσματα 2D NOESY. Οι δύο διαμορφώσεις του NGI25 οφείλονται στον τριτοταγή αμιδικό δεσμό N8-C9. Τέλος, η γειτονική εγγύτητα του τμήματος κυκλοεξυλίου του NGI με τον αρωματικό δακτύλιο είναι σύμφωνη με τα 2D φάσματα NOESY που ελήφθησαν, όπου παρατηρούνται NOE μεταξύ αυτών των τμημάτων του μορίου.

#### **4.6 Μοριακή σύνδεση**

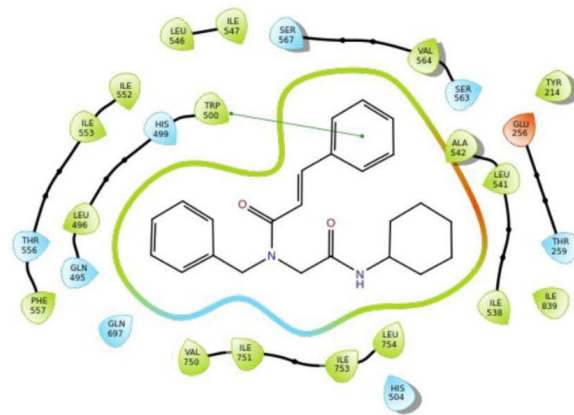
Εφαρμόστηκε η μέθοδος Induced Fit docking προκειμένου να αποκαλυφθεί η ισχυρή σύνδεση του NGI25 με τους δύο προαναφερθέντες ενζυμικούς στόχους (LOX-1 και BCHE) [139,140].



(a)



(b)



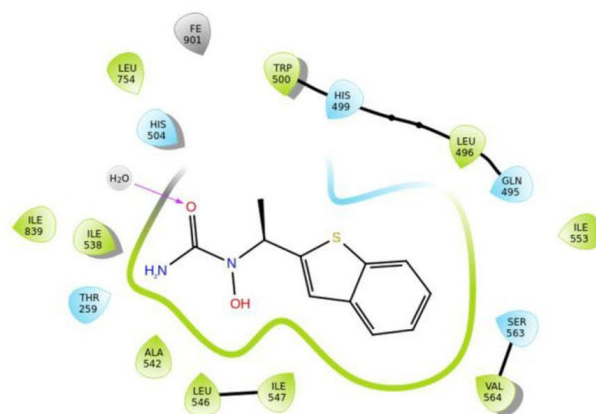
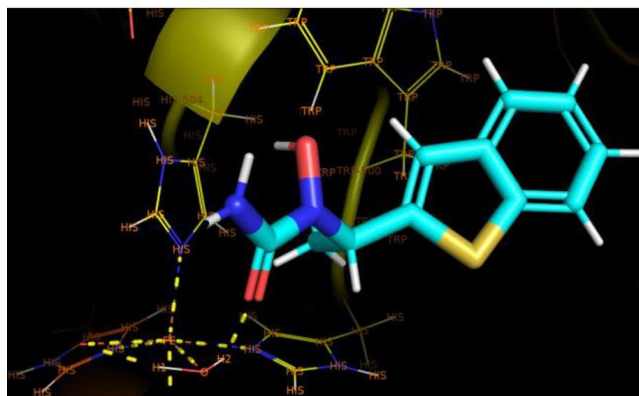
(c)

Εικόνα 4.16: (a) Το ενεργό κέντρο του LOX. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ του NGI25 και των αμινοξέων του LOX σε (b) τρισδιάστατη δομή και (c) δισδιάστατη δομή.

#### 4.6.1 LOX

Το ενεργό κέντρο των LOX χαρακτηρίζεται από ένα κατιόν Fe που συντονίζεται από 3 αμινοξέα ιστιδίνης και 1 αμινοξύ ισολευκίνης. Δεδομένου ότι το ενεργό κέντρο των ισομορφών LOX ακολουθεί ένα συγκεκριμένο μοτίβο, μπορούμε να υποθέσουμε ότι ένας ισχυρός συνδετικός παράγοντας της LOX της σόγιας θα μπορούσε επίσης να συνδεθεί με το ενεργό κέντρο της ανθρώπινης 5-LOX, καθώς και με άλλες ισομορφές LOX. Η εικόνα 4.5(a) δείχνει την υψηλή ομοιότητα των ενεργών θέσεων δύο διαφορετικών LOX, της LOX-1 της σόγιας

(αριστερά) και της 5-LOX (δεξιά) [141]. Το NGI25 συνδέεται ισχυρά με την ενεργή θέση της LOX-1 με βαθμολογία σύνδεσης  $\Delta G_{\text{bind}} = -12,20$  kcal/mol. Συγκεκριμένα, το NGI25 σχηματίζει έναν δεσμό υδρογόνου, ο οποίος απεικονίζεται με κίτρινο χρώμα (Εικόνα 4.5(b)), μεταξύ του NH και του μορίου νερού που συντονίζει το καταλυτικό Fe. Επιπλέον, σχηματίζεται μια αλληλεπίδραση p-p στίβαξης μεταξύ του αρωματικού δακτυλίου του NGI25 και του TRP500, το οποίο είναι ένα κρίσιμο αμινοξύ στην κοιλότητα του LOX. Επιπλέον, το υδρόφοβο τμήμα του μορίου είναι προσανατολισμένο προς τα λιπόφιλα αμινοξέα του ενεργού κέντρου, δηλαδή TRP500, VAL564, ILE547, LEU546, LEU541, ALA542 (Εικόνα 4.5(c)). Προκειμένου να δικαιολογήσουμε τα αποτελέσματα των *in silico* μελετών μας, επιλέξαμε έναν γνωστό αναστολέα για κάθε ένζυμο-στόχο (enzyme-target) ώστε να χρησιμεύσει ως πρότυπο στις μελέτες πρόσδεσης. Το Zileuton, το οποίο είναι γνωστό ότι αναστέλλει το LOX, σύμφωνα με τα *in silico* αποτελέσματα μας, συνδέεται ισχυρά με το ενεργό κέντρο του ενζύμου με  $\Delta G_{\text{bind}} = -8,56$  kcal/mol (Εικόνα 4.6.). Αυτή η τιμή είναι αρκετά υψηλότερη από την αντίστοιχη τιμή που έχει αναφερθεί για το NGI25, με σημαντική διαφορά  $\sim 4$  kcal/mol. Αυτό το αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι το μόριο που μελετάται θα μπορούσε να λειτουργήσει ως σημαντικός συνδετικός παράγοντας του ενζύμου LOX, καθώς σχηματίζει περισσότερες αλληλεπιδράσεις με την κοιλότητα του ενζύμου.



(a)

(b)

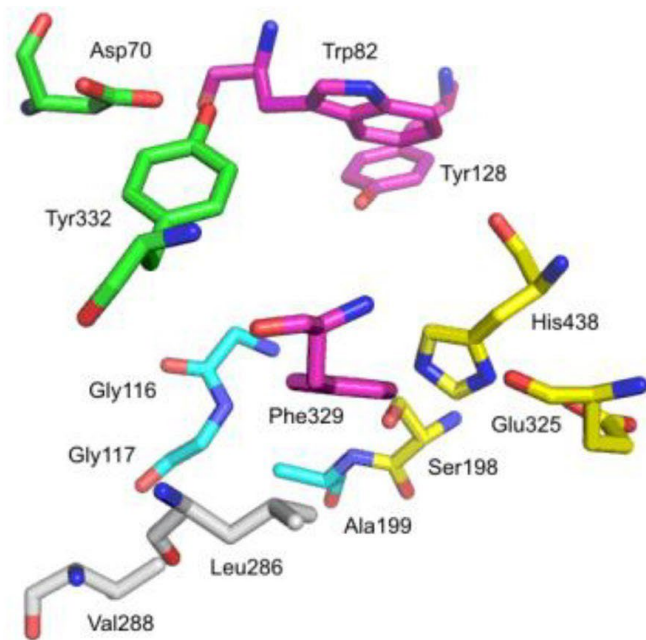
Εικόνα 4.17: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ του zileuton και των αμινοξέων του LOX σε (a) τρισδιάστατη δομή και (b) δισδιάστατη δομή.

#### 4.6.2 BCHE

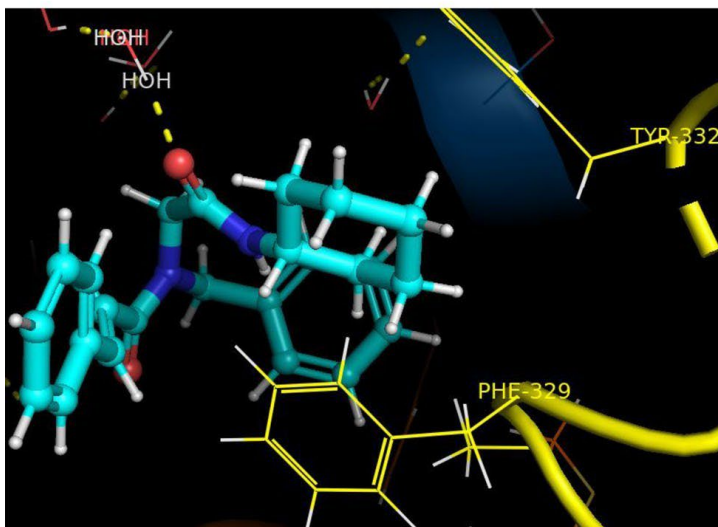
Το ενεργό κέντρο της BCHE απαρτίζεται από 13 αμινοξέα. Ειδικότερα, η καταλυτική τριάδα περιέχει τρία αμινοξέα: SER198, GLU325 και HIS438 (Εικόνα 4.7(a)) [142]. Επιπλέον, το NGI25 συνδέεται ισχυρά με το BCHE υποδεικνύοντας  $\Delta G_{\text{bind}} = -11,59 \text{ kcal/mol}$ . Σε αυτή την περίπτωση, το NGI25 σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με το αμινοξύ THR120 και ένα μόριο νερού του ενεργού κέντρου, ενώ δύο αλληλεπιδράσεις π-π στίβαξης συμβαίνουν μεταξύ των δύο αρωματικών δακτυλίων του NGI25 και των αμινοξέων PHE329 και TRP82 (Εικόνα 4.7(b)). Επιπλέον, σχηματίζονται δύο αρωματικοί δεσμοί υδρογόνου μεταξύ δύο φαινυλικών πρωτονίων του NGI25 και της καρβονυλικής ομάδας της HIS438. Τέλος, οι αρωματικοί δακτύλιοι και το κυκλοεξυλικό τμήμα του NGI25 είναι προσανατολισμένα προς τα υδρόφοβα αμινοξέα της κοιλότητας, δηλαδή TRP231, ALA199, ALA328, PHE329, VAL331, TYR332 (Εικόνα 4.7(c)).

Ο γνωστός αναστολέας της BCHE που επιλέχθηκε προκειμένου για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων πρόσδεσης για το NGI, ήταν η ριβασιγμίνη. Η ριβασιγμίνη συνδέεται ισχυρά με το ενεργό κέντρο της BCHE με  $\Delta G_{\text{bind}} = -10,05 \text{ kcal/mol}$ . Η ίδια τιμή που υπολογίστηκε για το σύμπλοκο «NGI-BCHE» ήταν χαμηλότερη, υποδεικνύοντας ότι το NGI25 θα μπορούσε

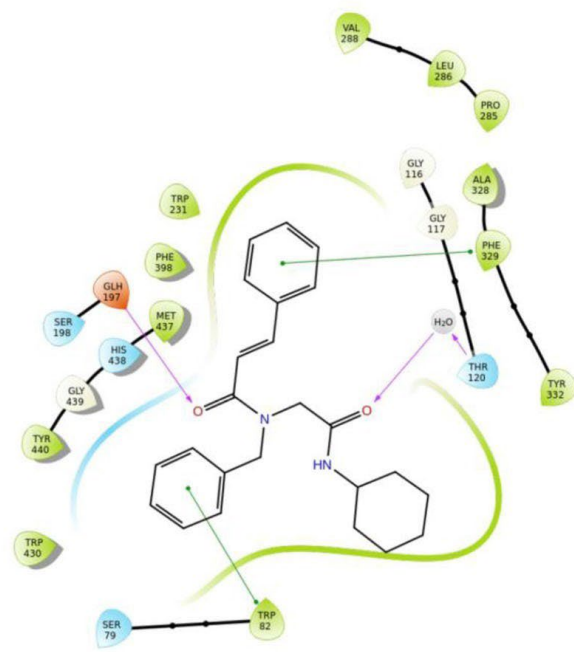
να είναι ένας σημαντικός παράγοντας κατά της ΒCΗΕ. Επιπλέον, ορισμένες αλληλεπιδράσεις που σχηματίζει το ΝGΙ με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου, παρατηρούνται επίσης κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του συμπλόκου «ριβαστιγμίνη-ΒCΗΕ». Αυτές οι αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν τη π-π στίβαξη μεταξύ του αρωματικού δακτυλίου της ριβαστιγμίνης και του TRP82, καθώς και τον σχηματισμό ενός δεσμού υδρογόνου με ένα μόριο νερού που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο. Μια επιπλέον αλληλεπίδραση που παρατηρείται στο σύμπλοκο «ριβαστιγμίνη-ΒCΗΕ» είναι ο σχηματισμός ενός π-κατιόντος μεταξύ της θετικά φορτισμένης αμινικής ομάδας της ριβαστιγμίνης και του αρωματικού δακτυλίου του TRP82. Τέλος, το υδρόφοβο τμήμα της ριβαστιγμίνης είναι επίσης προσανατολισμένο προς τα ίδια υδρόφοβα αμινοξέα της κοιλότητας, δηλαδή TRP231, ALA199, ALA328, PHE329, VAL331, TYR332 (Εικόνα 4.9(α)).



(a)

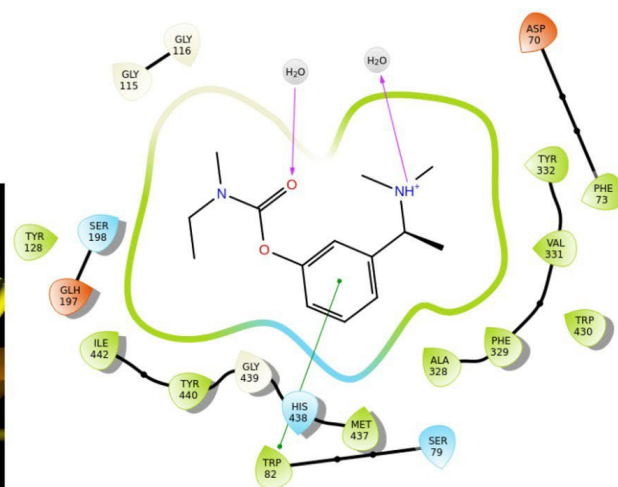


(b)



(c)

Εικόνα 4.18: (a) Το ενεργό κέντρο της BCHE. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ του NGI25 και των αμινοξέων της BCHE σε (b) τρισδιάστατη δομή και (c) δισδιάστατη δομή



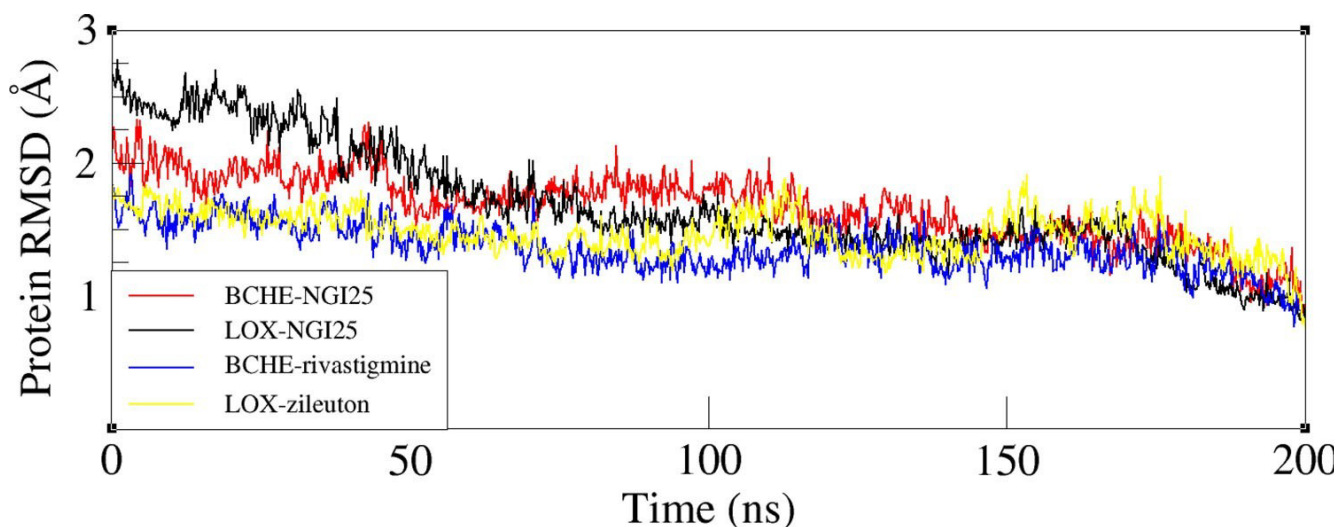
(a)

(b)

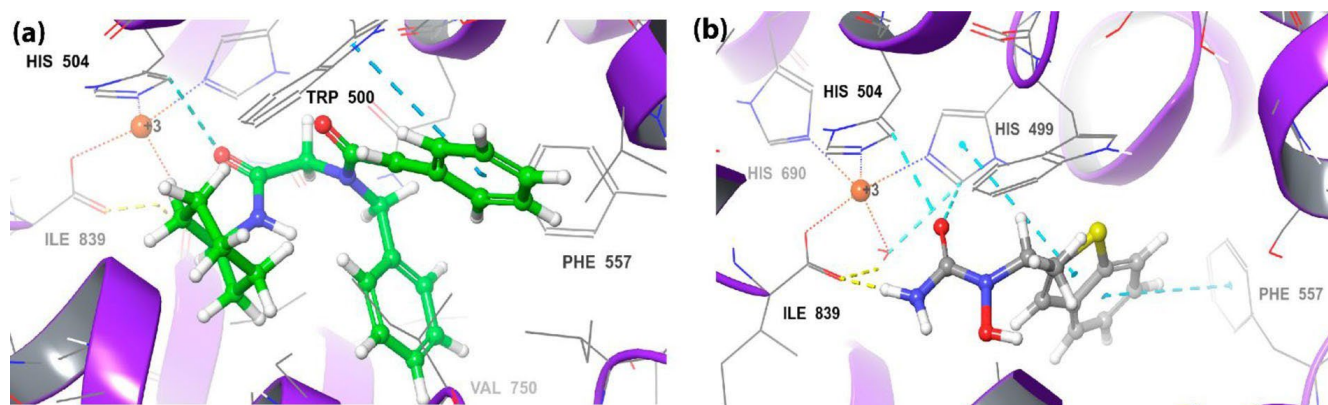
Εικόνα 4.19: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ριβαστιγμίνης και των αμινοξέων της BCHE σε (a) τρισδιάστατη δομή και (b) δισδιάστατη δομή.

#### 4.7 Μοριακή δυναμική των συμπλόκων «ενζύμου-προσδέτη»

Πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής στα τέσσερα σύμπλοκα «ενζύμου-προσδέτη», τα οποία προέκυψαν από μελέτες μοριακής πρόσδεσης [143]. Το σύμπλοκο που έδειξε τη χαμηλότερη τιμή  $\Delta G_{\text{bind}}$  για κάθε προσδέτη, επιλέχθηκε ως αρχική δομή για τις μελέτες MD. Οι προσομοιώσεις MD έδειξαν ότι οι υπό μελέτη προσδέτες παρέμειναν σταθεροί στις κοιλότητες των ενζύμων κατά τη διάρκεια ολόκληρου του χρόνου προσομοίωσης (200 ns). Το διάγραμμα RMSD (Εικόνα 4.10) δείχνει τη σταθερότητα κάθε συστήματος κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων. Κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης, οι προσδέτες εντός της κοιλότητας των ενζύμων υιοθέτησαν ελαφρώς διαφορετικές, πιο ευνοϊκές διαμορφώσεις από αυτές που προέκυψαν από τις μελέτες πρόσδεσης. Προκειμένου να αξιολογηθεί περαιτέρω η σταθερότητα των προσδετών, πραγματοποιήθηκε ανάλυση συστάδων στις τροχιές που αποκτήθηκαν για κάθε σύμπλοκο. Οι τροχιές χωρίστηκαν σε 10 συστάδες προκειμένου να αποκαλυφθεί η διαμόρφωση του προσδέτη που είναι στατιστικά κυρίαρχη κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης.



Εικόνα 4.20: Τιμές RMSD των πρωτεϊνών σε σύμπλοκα «ενζύμου-προσδέτη» για 200 ns της προσομοίωσης, λαμβάνοντας ως δομή αναφοράς τη στάση που προέκυψε από μελέτες πρόσδεσης.



Εικόνα 4.21: Τρισδιάστατες θέσεις (α) NGI25 και (β) zileuton στην κοιλότητα της LOX. Και οι δύο θέσεις προέρχονται από το κυρίαρχο σύμπλεγμα των αντίστοιχων προσομοιώσεων MD.

#### 4.7.1 LOX

Η ανάλυση συστάδων τροχιάς στο σύμπλεγμα «LOX-NGI25» αποκάλυψε ότι η κυρίαρχη διαμόρφωση του NGI εντός της κοιλότητας διαρκεί για το 54% του χρόνου προσομοίωσης. Η θέση του NGI μέσα στην κοιλότητα του LOX απεικονίζεται στην Εικόνα 4.11(α). Το NGI βρίσκεται σε γειτονική απόσταση με το καταλυτικό Fe στο ενεργό κέντρο της LOX (~2,9 Å), ενώ σχηματίζει μια αλληλεπίδραση π-π με το TRP500, το οποίο είναι ένα κρίσιμο κατάλοιπο

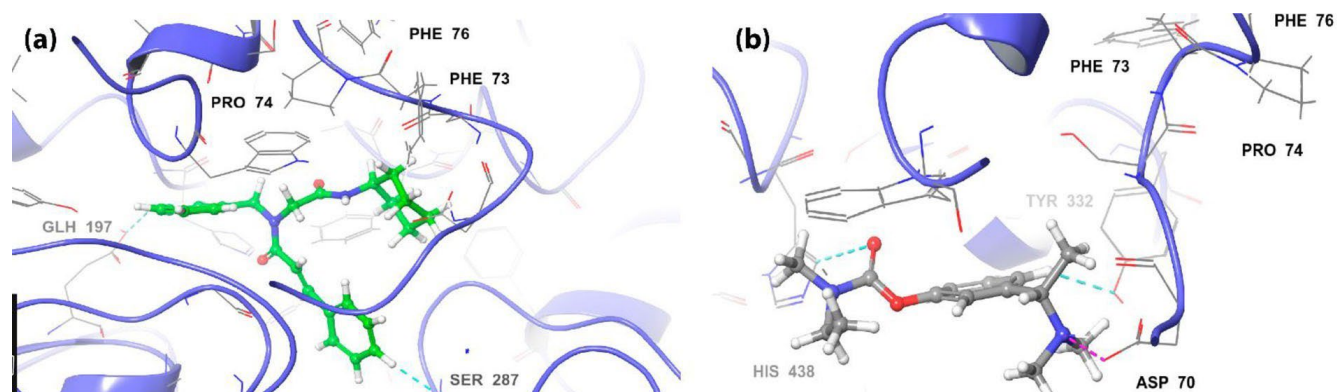
της κοιλότητας του ενζύμου. Αυτή η αλληλεπίδραση έχει παρατηρηθεί προηγουμένως σε μελέτες πρόσδεσης. Επιπλέον, σχηματίζεται ένας αρωματικός δεσμός υδρογόνου μεταξύ της καρβονυλικής ομάδας του NGI25 που βρίσκεται κοντά στο κυκλοεξάνιο και του αρωματικού πρωτονίου του HIS504, το οποίο είναι ένα αμινοξύ στην πρώτη σφαίρα συντονισμού του Fe. Επιπλέον, το υδρόφοβο τμήμα του μορίου (αρωματικοί δακτύλιοι) είναι προσανατολισμένο προς τα υδρόφοβα αμινοξέα της κοιλότητας, δηλαδή ILE553, ILE552, TRP500, PHE557, VAL750.

Παρόμοιες αλληλεπιδράσεις έχουν παρατηρηθεί και για το σύμπλοκο «LOX-zileuton». Ο γνωστός αναστολέας LOX, με βάση τη στάση που προέκυψε από το κυρίαρχο σύμπλεγμα μετά από μελέτες MD (40% χρόνος προσομοίωσης), σχηματίζει μια αλληλεπίδραση π-π με HIS504 και HIS499 με την καρβονυλική του ομάδα. Επιπλέον, η αρωματική υποδομή του μορίου σχηματίζει δύο κατιόντα π-π με τα αμινοξέα PHE557 και HIS499. Τέλος, παρατηρείται ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ του πρωτονίου της αμινικής ομάδας του NGI και του ILE839 της κοιλότητας Εικόνα 4.11(β).

#### **4.7.2 BCHE**

Η ανάλυση συστάδων τροχιάς στο σύμπλοκο «BCHE-NGI25» αποκάλυψε ότι η κυρίαρχη διαμόρφωση του NGI μέσα στο ενεργό κέντρο διαρκεί για το 39% του χρόνου προσομοίωσης. Η θέση του NGI μέσα στην κοιλότητα απεικονίζεται στην Εικόνα 4.12(α). Το NGI σχηματίζει έναν δεσμό υδρογόνου μεταξύ του φαινυλικού πρωτονίου του αρωματικού δακτυλίου και της καρβονυλικής ομάδας του SER287. Επιπλέον, παρατηρείται ένας άλλος αρωματικός δεσμός υδρογόνου μεταξύ της καρβοξυλικής ομάδας του GLU197 και του πρωτονίου του δεύτερου αρωματικού δακτυλίου του NGI. Επιπλέον, το υδρόφοβο τμήμα του μορίου (αρωματικοί δακτύλιοι και κυκλοεξάνιο) είναι προσανατολισμένο προς τα υδρόφοβα αμινοξέων της κοιλότητας, δηλαδή PHE76, PHE73, PRO74. Ο γνωστός αναστολέας BCHE, η ριβαστιγμίνη, με βάση το κυρίαρχο σύμπλεγμα μετά από μελέτες MD (21% χρόνος προσομοίωσης), βρίσκεται στην ίδια κοιλότητα με το NGI, που είναι το ενεργό κέντρο. Το λιπόφιλο τμήμα του μορίου είναι επίσης προσανατολισμένο προς τα υδρόφοβα αμινοξέα, PHE76, PHE74, PRO73, ενώ σχηματίζεται μια γέφυρα άλατος (salt bridge) μεταξύ της θετικά φορτισμένης αμινικής ομάδας της ριβαστιγμίνης και του καρβοξυλίου του ASP70. Τέλος, παρατηρούνται

δύο αρωματικοί δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του αναστολέα και των αμινοξέων HIS438 και TYR332 του ενεργού κέντρου (Εικόνα 4.12(β)).



**Εικόνα 4.22:** Τριδιάστατες θέσεις (a) NGI25 και (b) ριβαστιγμίνης στην κοιλότητα του BCHE. Και οι δύο θέσεις προέρχονται από το πιο κυρίαρχο σύμπλεγμα των αντίστοιχων προσομοιώσεων MD.

#### 4.8 Υπολογισμοί MM/GBSA

Οι υπολογισμοί MM/GBSA έχουν εφαρμοστεί στα στατιστικά κυρίαρχα σύμπλοκα «ενζύμου-προσδέτη» που προέκυψαν από την ομαδοποίηση της τροχιάς Desmond. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.1) απεικονίζονται οι ενέργειες πρόσδεσης του NGI25 και των γνωστών αναστολέων και για τα δύο ένζυμα. Σύμφωνα με τις τιμές  $\Delta G_{\text{bind}}$  που παρουσιάζονται στον πίνακα, το NGI25 συνδέεται ευνοϊκά με το ενεργό κέντρο και των δύο ενζύμων και η τιμή  $\Delta G$  είναι χαμηλότερη για το NGI25 σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή για τους γνωστούς αναστολείς. Στην κοιλότητα του LOX, για το πιο εμφανές σύμπλεγμα του NGI25 (54% του χρόνου προσομοίωσης), το  $\Delta G_{\text{bind}}$  υπολογίζεται σε  $-52,80$  kcal/mol, ενώ για το zileuton (40% του χρόνου προσομοίωσης) η τιμή  $\Delta G_{\text{bind}}$  είναι αρκετά χαμηλότερη ( $-30,80$  kcal/mol). Τέλος, στο ενεργό κέντρο του BCHE, για το πιο εμφανές σύμπλεγμα του NGI25 (39% του προσομοίωσης χρόνου), η  $\Delta G_{\text{bind}}$  υπολογίζεται στο  $-50,74$  kcal/mol, ενώ για τη ριβαστιγμίνη (21% του χρόνου προσομοίωσης) η τιμή  $\Delta G_{\text{bind}}$  είναι χαμηλότερη ( $-41,44$  kcal/mol). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.

**Πίνακας 4.1:  $\Delta G_{\text{δέσμευσης}}$  των συμπλόκων «ενζύμου-προσδέτη» όπως υπολογίστηκε μετά από μελέτες Μοριακής Δυναμικής.**

<b>Ενώσεις που προσδέονται στη LOX</b>	<b><math>\Delta G_{\text{δέσμευσης}}</math> (MM/GBSA)</b>
Zileuton	-30,80
NGI25	-52,80
<b>Ενώσεις που προσδέονται στη BCHE</b>	<b><math>\Delta G_{\text{δέσμευσης}}</math> (MM/GBSA)</b>
Ριβασταγγίνη	-41,44
NGI25	-50,74

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στην ταυτοποίηση και ανάλυση της διαμόρφωσης του κινναμικού παραγώγου NGI25. Η ταυτοποίηση του μορίου επιτεύχθηκε με χρήση φασματοσκοπίας 1D και 2D NMR χρησιμοποιώντας ομοπυρηνικά και ετεροπυρηνικά πειράματα. Η ανάλυση διαμόρφωσης επιτεύχθηκε από ένα συνδυασμό φασματοσκοπίας NMR και υπολογιστικών μελετών (MM, MD και QM).

Η ανάλυση διαμόρφωσης του NGI25 έδειξε ότι το μόριο υιοθετεί παρόμοιες διαμορφώσεις σε διαλύτες DMSO και CHCl<sub>3</sub>. Η πιο σημαντική ιδιότητα διαμόρφωσης του μορίου είναι η ορθογώνια σχέση μεταξύ των δύο αρωματικών δακτυλίων, η οποία υποστηρίζεται από τα πειραματικά δεδομένα και επιβεβαιώνεται από τα θεωρητικά.

Μέσω εκτεταμένης βιβλιογραφικής έρευνας και χρήσης του SwissTarget module, το NGI25 ανακαλύφθηκε ως πιθανός παράγοντας πρόσδεσης των ενζύμων βουτυρυλοχολινεστεράσης και λιποξυγονάσης. Πράγματι, τα αποτελέσματα της πρόσδεσης που πραγματοποιήθηκαν επιβεβαίωσαν αυτή την πρόβλεψη. Συγκεκριμένα, το NGI25 έδειξε ισχυρή σύνδεση τόσο με το ενεργό κέντρο του LOX όσο και με το ενεργό κέντρο του BCHE, με  $\Delta G_{\text{bind}}$  υπολογισμένο σε  $-12,20$  kcal/mol και  $-11,59$  kcal/mol, αντίστοιχα. Έχει επιλεγεί ένας γνωστός αναστολέας για κάθε ένζυμο, προκειμένου να επικυρωθούν οι παρατηρούμενες ενέργειες σύνδεσης. Και στις δύο περιπτώσεις, το NGI25 έδειξε χαμηλότερη ενέργεια σύνδεσης με αυτά τα ένζυμα σε σύγκριση με τα πρώτυπα, zileuton και ριβαστιγμίνη, τα οποία υποβλήθηκαν στις ίδιες *in silico* μελέτες. Επιπλέον, το NGI25 παρέμεινε σταθερό εντός των ενεργών θέσεων και των δύο ενζύμων κατά τη διάρκεια ολόκληρου του χρόνου προσομοίωσης των MD προσομοιώσεων. Οι υπολογισμοί MM/GBSA πραγματοποιήθηκαν στο κυρίαρχο σύμπλεγμα των μελετών MD για όλα τα σύμπλοκα «ένζυμου-προσδέτη». Τα αποτελέσματα MM/GBSA επιβεβαίωσαν επίσης την υψηλότερη συγγένεια του NGI25 με τις κοιλότητες και των δύο ενζύμων σε σύγκριση με το zileuton και τη ριβασταγμίνη. Το NGI25 συνδέεται ισχυρά σε χωρική εγγύτητα με το καταλυτικό Fe της κοιλότητας LOX και αλληλεπιδρά με πολλά από τα

κρίσιμα αμινοξέα του ενεργού κέντρου, όπως παρατηρείται επίσης σε αρκετές *in silico* μελέτες για την αναστολή LOX [140,144]. Επιπλέον, οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζει το NGI με τα κρίσιμα αμινοξέα του ενεργού κέντρου του BCHE είναι αρκετά παρόμοιες σε μια ποικιλία αναστολέων του BCHE που έχουν ανακαλυφθεί στη βιβλιογραφία [144-147]. Ως εκ τούτου, το NGI25 θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως σημαντικός παράγοντας για τον σχεδιασμό φαρμάκων κατά της νόσου του Alzheimer και άλλων νευρολογικών ασθενειών.

Οι πληροφορίες που αποκτήθηκαν σχετικά με τις διαμορφωτικές ιδιότητες και την πρόβλεψη στόχων του NGI25 μπορεί επίσης να βοηθήσουν τους συνθετικούς χημικούς που επιθυμούν να αναπτύξουν αναλογικά της κινναμικής με καλύτερα βιολογικά προφίλ και φαρμακολογικές ιδιότητες.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 2: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Density Functional Theory	Θεωρία Συναρτησιακού Πυκνότητας
Salt bridge	Γέφυρα άλατος
Enzyme-target	Ένζυμο-στόχος
B-factor	Παράγοντας B
Module	Ενότητα
Protein preparation wizard	Οδηγός προετοιμασίας πρωτεϊνών
Sketched	Δομήθηκε
Workstations	Σταθμοί εργασίας
GPU implementation of the MD simulation codes	Εφαρμογές των κωδίκων προσομοίωσης MD σε κάρτες γραφικών
Rigid	Άκαμπτη
Velocity resampling	Ταχύτητα επαναδειγματοληψίας
Grid scan	Συστηματική ανάλυση
Fast temperature relaxation constant	Γρήγορη σταθερά θερμοκρασίας εφησυχασμού
Fast and slow constant relaxation pressure	Γρήγορη και αργή σταθερά πίεσης εφησυχασμού
Force field	Πεδίο δυνάμεων
Molecular Docking	Μοριακή πρόσδεση
Ensemble	Σύνολο

NPT ensemble	Εξομοίωση όπου οι τιμές των, N (αριθμός μορίων), P (πίεση) και T (θερμοκρασία) παραμένουν σταθερές
NVT ensemble	Εξομοίωση όπου οι τιμές των, N (αριθμός μορίων), V (όγκου) και T (θερμοκρασία) παραμένουν σταθερές
Multistep RESPA	Πολυβηματικός ολοκληρωτής RESPA
Polarizable continuum model	Συνεχές πολώσιμο μοντέλο
Conjugate gradient method	Μέθοδος συσσευγμένων βαθμίδων
“Add metal binding states”	Προσθήκη καταστάσεων σύνδεσης μετάλλου
Density Functional Theory	Υπολογισμός πυκνότητας λειτουργικής θεωρίας
In vivo	Σε έμβιο οργανισμό
In silico	Μέσω προσομοίωσης σε υπολογιστή
A549	Κυτταρική σειρά καρκινικών κυττάρων ανθρώπινου πνεύμονα

## Συντμήσεις–Αρκτικόλεξα–Ακρωνύμια

### Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

AKT	Protein Kinase B
ALT	Alanine aminotransferase
AM1	Austin Model 1
ASK1	Apoptosis Signal-regulating Kinase1
AST	Aspartate aminotransferase
B3LYP	Becke, 3-parameter, Lee-Yang-Parr
BCHE	Butyrylcholinesterase
c-CA	cis-Cinnamic acid
CA-NPs	Cinnamic acid nanoparticles
CAPE	Caffeic acid phenethylester
CG	Conjugate gradient
CML	Chronic myeloid leukemia
CNDO	Complete Neglect of Differential Overlap
COSY	Correlation spectroscopy
CRC	Colorectal cancer
DFT	Density Functional Theory
D-Gal	D-galactosamine
DMARDs	Disease-induced anti-rheumatoid arthritis drugs
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
FLS	Fibroblast-like synoviocytes
GRAS	Generally Recognized as Safe
HDAC	Histone deacetylase
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
IBD	Inflammatory bowel disease
IFD	Induced Fit Docking

IL-1 $\beta$	Interleukin-1 beta
IL-6	Interleukin-6
IL-12	Interleukin-12
IL-23	Interleukin-23
IMCR	Isocyanide-based Multicomponent Reactions
LD50	Median lethal dose
LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharide
LUAD	Lung Adenocarcinoma
MAOIs	Monoamineoxidase inhibitors
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCR	Multicomponent reactions
MD	Molecular Dynamics
MM/GBSA	Molecular Mechanics/ Generalized Born Surface Area
MMP-2	Matrixmetalloproteinase-2
MMP-9	Matrixmetalloproteinase-9
MRSA	Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response88
NDDO	Neglect of Diatomic Differential Overlap
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor-kappa B
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
Nrf2	Nuclear factorery throid2-related factor2
NSAID	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs
NSCLC	Non-small cell lung cancer
OS	Overall survival
PA	Pseudomonas aeruginosa
PCM	Polarizable continuum model
PI3K	Phosphatidylinositol3-kinase
PME	Particle Mesh Ewald
PM3	Parametric Method 3

PM6	Parametric Method 6
-----	---------------------

PPM	Parts per million
QM	Quantum Mechanics
RESPA	Reference System Propagator Algorithms
RMSD	Root-Mean-Square Deviation
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxide dismutase
SSRIs	Selective serotonin reuptake inhibitors
t-CA	trans-Cinnamic acid
TKIs	Tyrosine kinase inhibitors
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
UC	Ulcerative colitis
ZDO	Zero differential overlap
PA	Ρευματοειδής αρθρίτιδα
ΦΜ	Φαρμακευτικά μόρια

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ NGI25

Πίνακας Π3: Αντιστοίχιση των κορυφών του φάσματος <sup>1</sup>H του NGI25 σε CDCl<sub>3</sub> (πάνω) και DMSO-d<sub>6</sub> (κάτω)

Κορυφή	Χημική μετατόπιση (ppm)	Κορυφή	Χημική μετατόπιση (ppm)	Κορυφή	Χημική μετατόπιση (ppm)
3ax'	0.88 (q)	3eq'	1.69 (s)	10'	6.70 (d)
5ax'	1.07 (d)	4eq	1.72 (s)	10	6.90 (d)
3ax	1.19 (s)	3eq	1.89 (s)	18'	7.27 (d)
5ax	1.21 (s)	2	3.72 (s)	20	7.34 (d)
4ax'	1.28 (s)	7	4.10 (s)	14/15/18/19	7.38 (m)
4ax	1.37 (d)	16	4.83 (s)	13	7.50 (d)
5eq	1.58 (s)	1'	5.58 (s)	11	7.84 (d)
4eq'	1.62 (s)				

Κορυφή	Χημική μετατόπιση (ppm)	Κορυφή	Χημική μετατόπιση (ppm)	Κορυφή	Χημική μετατόπιση (ppm)
5ax	1.10 (s)	7	3,95 (s)	15	7.37 (m)
3ax	1.14 (d)	7'	4,10 (s)	14	7.42 (m)

4ax	1.25 (d)	16'	4,60 (s)	11	7.54 (d)
5eq	1.54 (m)	16	4,85 (s)	19	7.58 (d)
4eq	1.69 (m)	10/10'	7,08 (d)/7.24 (m)	13	7.67 (d)
3eq	1.75 (m)	18	7,25 (m)	1	7.91 (d)
2	3.54 (m)	20	7,32 (m)	1'	7.75 (d)

s= singlet, d= doublet, q= quartet, m= multiplet

**Πίνακας Π4: Αντιστοίχιση των κορυφών του φάσματος  $^{13}\text{C}$  του NGI25 σε  $\text{CDCl}_3$  (πάνω) και  $\text{DMSO-d}_6$  (κάτω)**

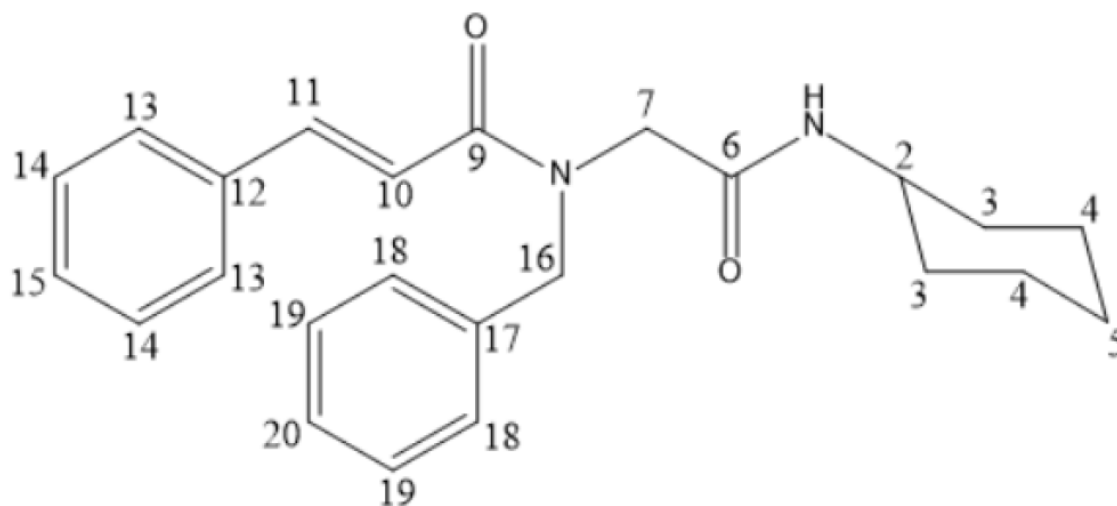
<b>Κορυφή</b>	<b>Χημική μετατόπιση (ppm)</b>	<b>Κορυφή</b>	<b>Χημική μετατόπιση (ppm)</b>	<b>Κορυφή</b>	<b>Χημική μετατόπιση (ppm)</b>
4	24.7	18	126.8	17	136.1
5	25.5	13	128.0	11	144.6
3	32.8	20	128.0	9'	167.2
2	48.2	19	128.9	6'	167.4
7	51.5	14 ή 15	129.1	9	168.0
16	52.6	14 ή 15	130.1	6	168.2
10	116.4	12	134.8		

Κορυφή	Χημική μετατόπιση (ppm)	Κορυφή	Χημική μετατόπιση (ppm)	Κορυφή	Χημική μετατόπιση (ppm)
4	25.0	20	126.0	17	137.5
5	26.0	18	127.6	11	143.0
3	33.0	19	128.0	9'	166.5
2	48.0	13	128.0	6'	167.0
7/7'	49.0/50.0	14	128.0	9	167.5
16/16'	52.0/50.0	15	130.0	6	168.0
10	118.0	12	135.0		

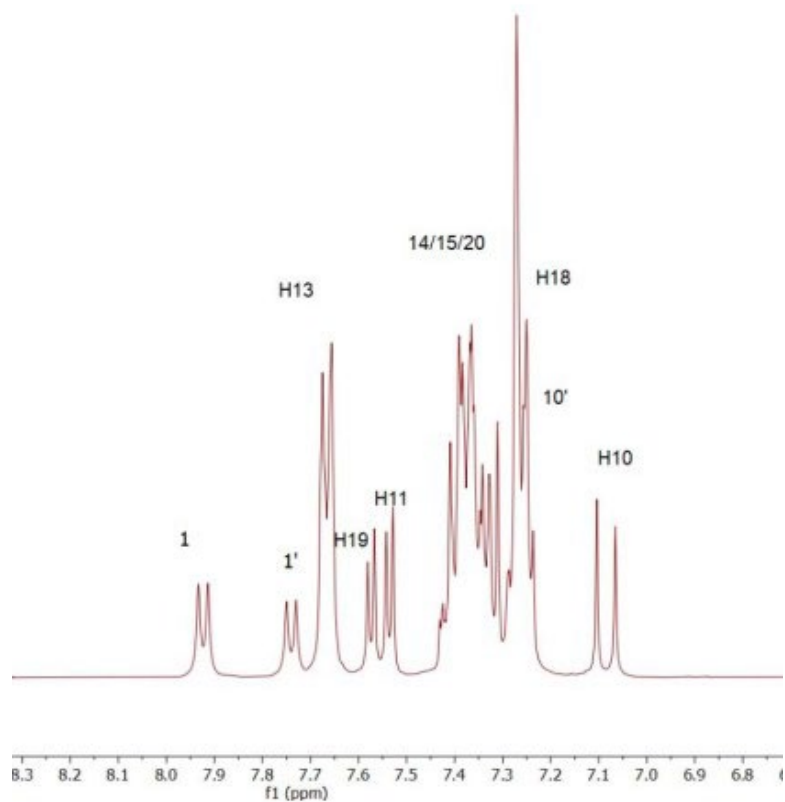
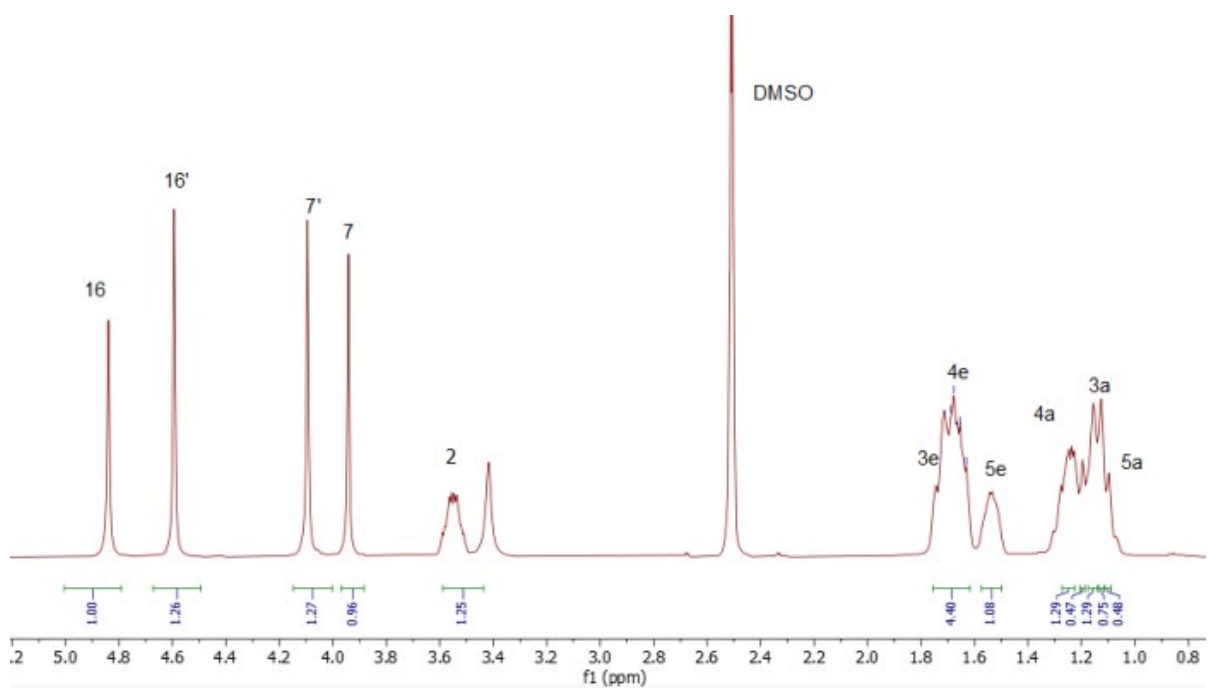
**Πίνακας Π5: Οι διέδρες γωνίες και οι αποστάσεις ανάμεσα στα πρωτόνια για τις τρεις μεθόδολογίες**

ΓΩΝΙΑ (°)	ΜΕΘΟΔΟΣ GRID SCAN	ΗΜΙ-ΕΜΠΕΙΡΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ PM6	ΜΕΘΟΔΟΣ DFT
φ1= 10-9-8-7	180.30°	187.73°	184.49°
φ2=9-8-7-6	271.90°	271.46°	321.39°
ΑΠΟΣΤΑΣΕΙΣ (Å)			
H18-H13	3.73	4.53	4.50
H7-H10	2.12	4.66	4.59

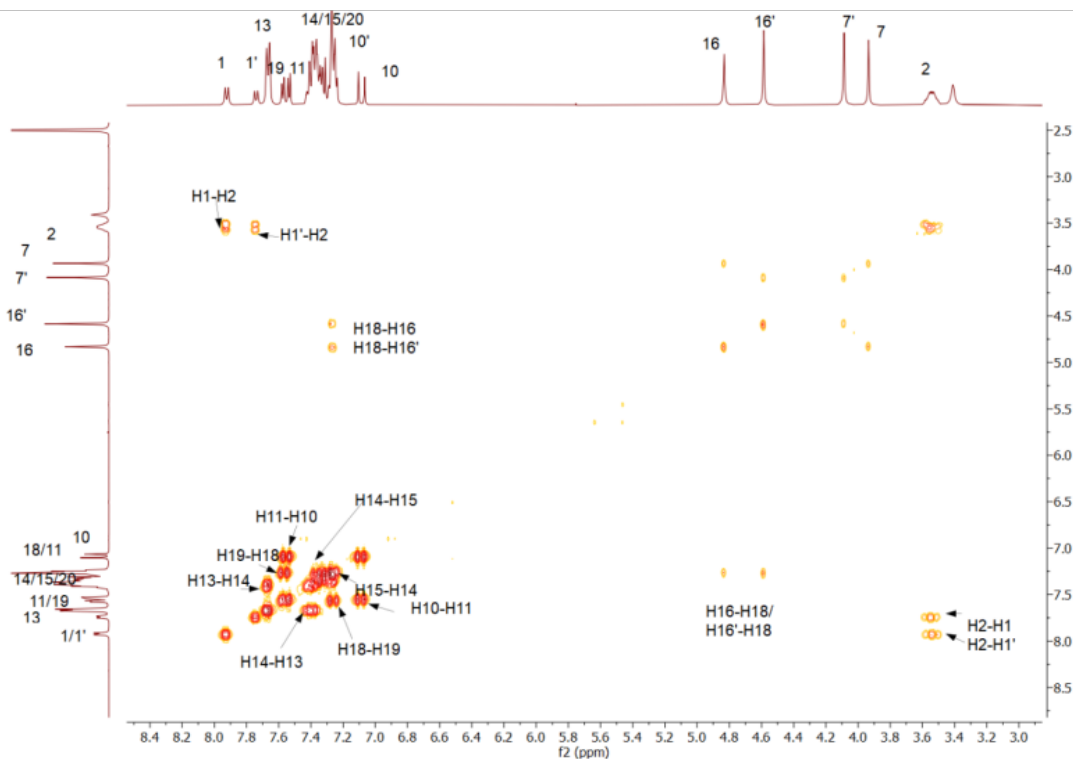
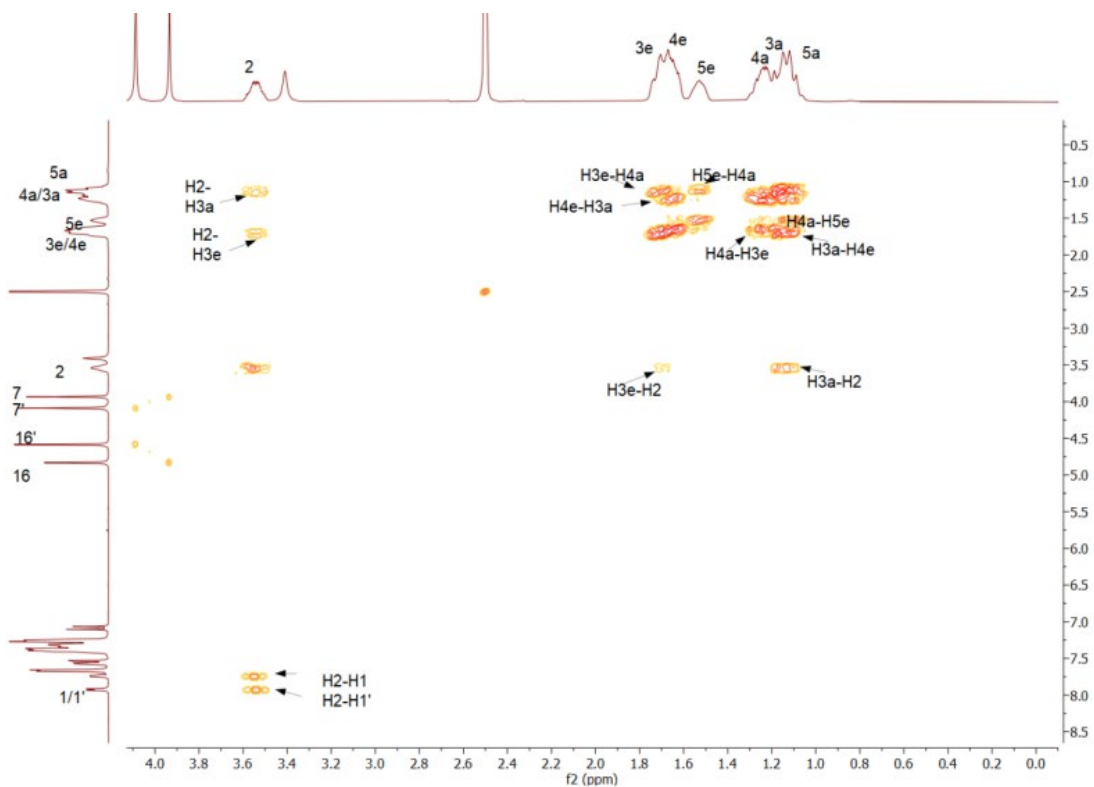
H7-H16	2.69	2.35	2.50
H7-H18	2.66	2.49	4.11
H7-H1	3.33	3.66	2.39
H10-H13	2.23	2.42	2.19



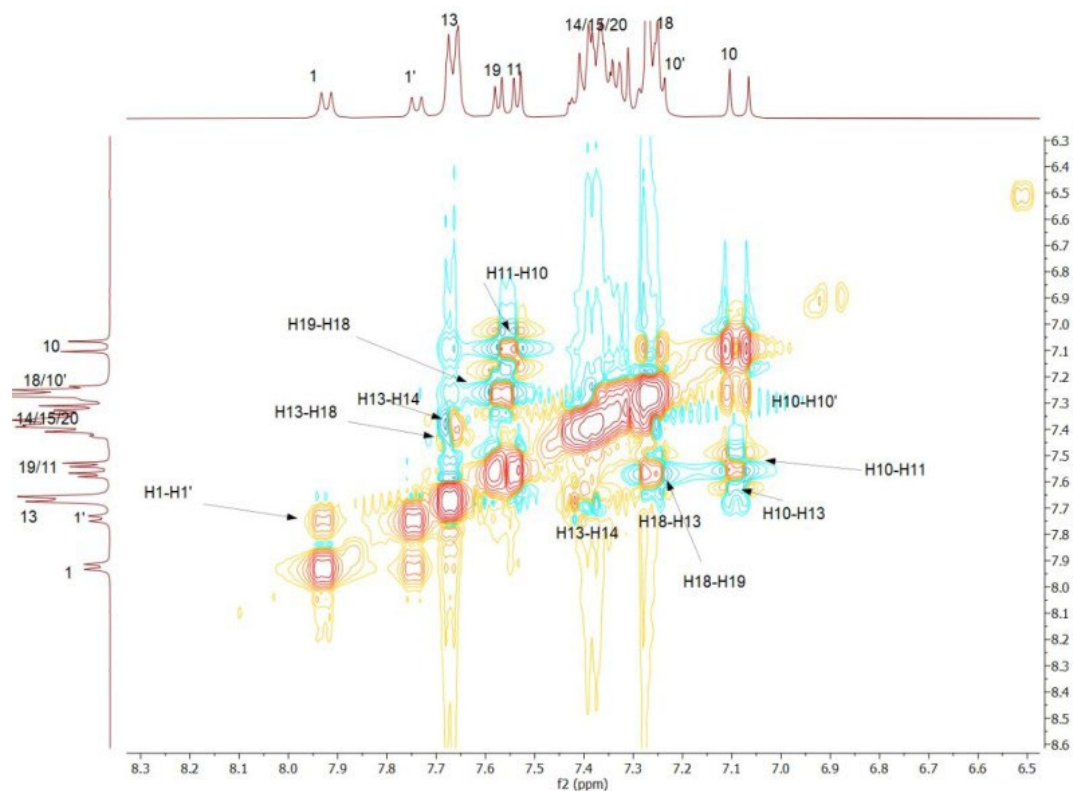
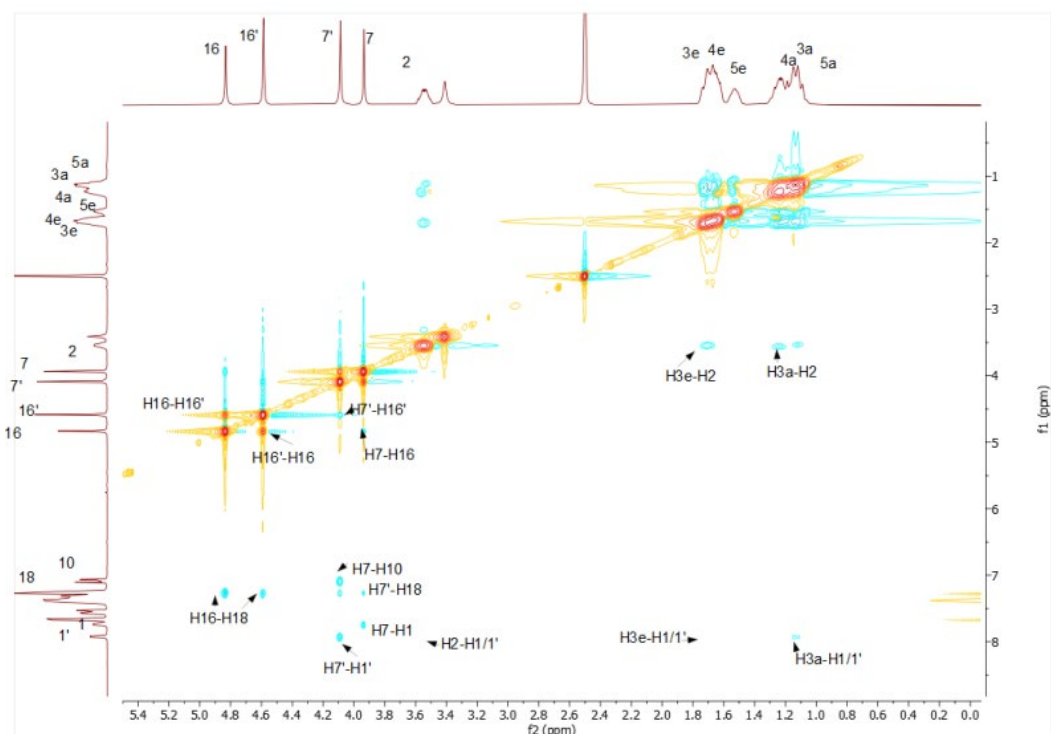
Σχήμα Π5: Δομή του μορίου NGI25 που φέρει αρίθμηση στους άνθρακες του όπως αυτοί χρησιμοποιήθηκαν κατά την ταυτοποίησή τους.



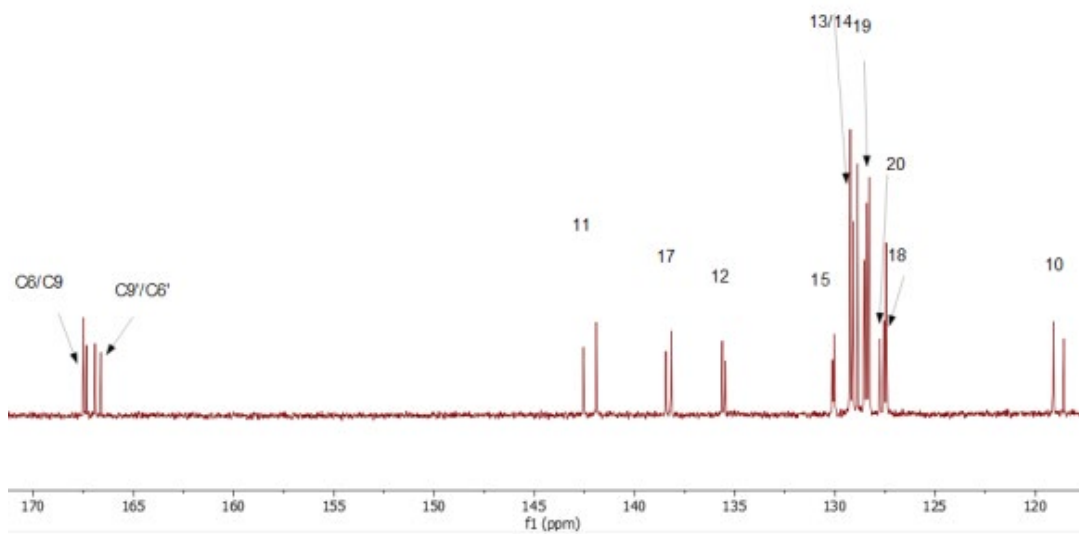
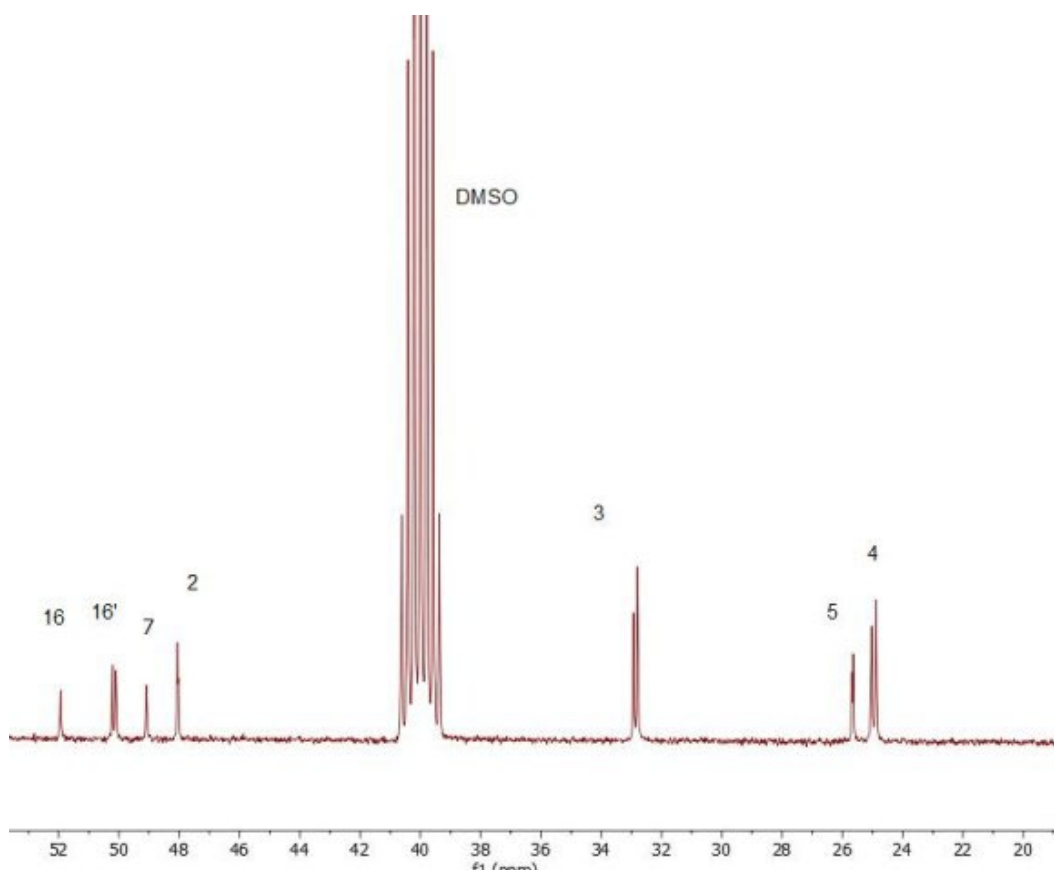
Εικόνα Π23: Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR του NGI25. (άνω) Αλειφατική περιοχή του NGI25 (κάτω) αρωματική περιοχή. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε DMSO-d<sub>6</sub> σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



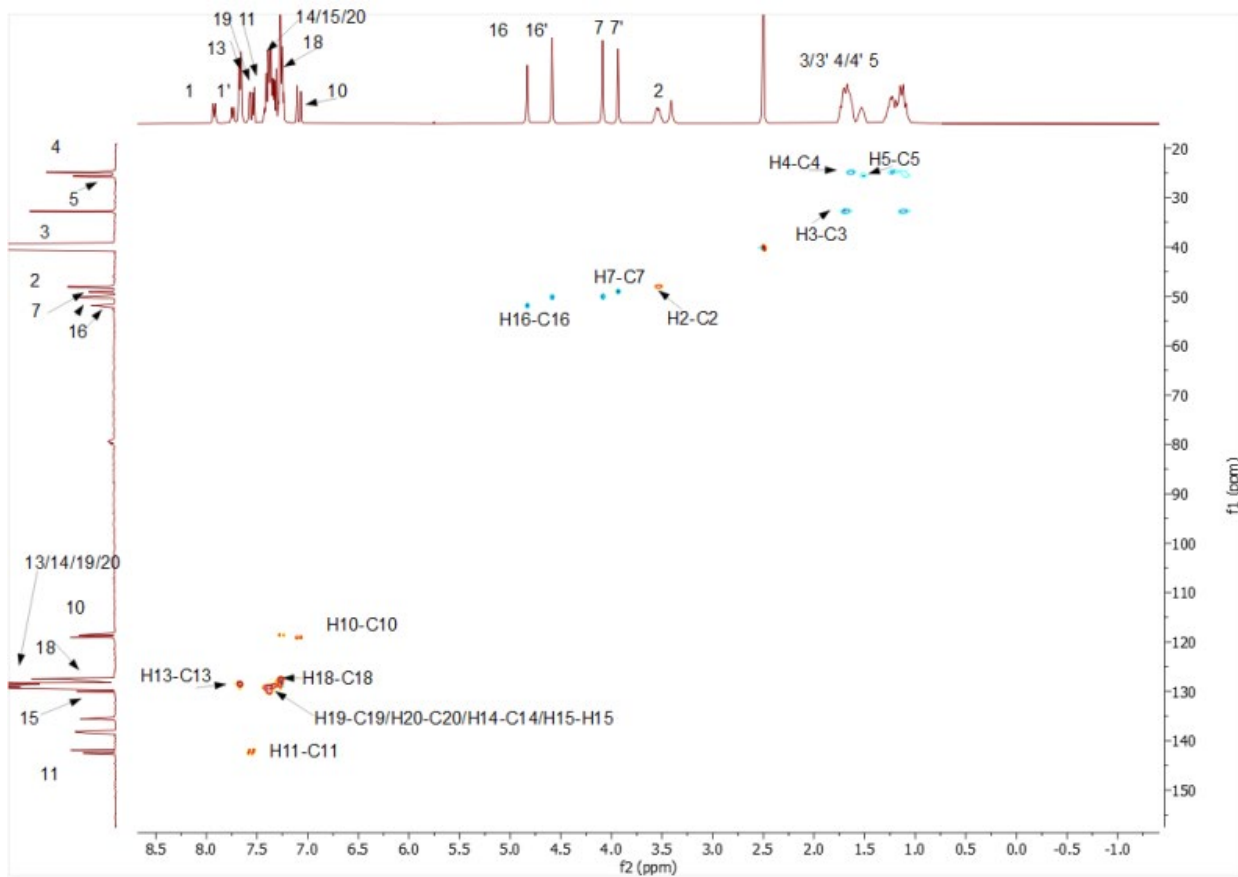
Εικόνα Π24: Φάσματα 2D-COSY-NMR του NGI25. (άνω) Αλειφατική περιοχή του NGI25 (κάτω) αρωματική περιοχή. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε DMSO-d<sub>6</sub> σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



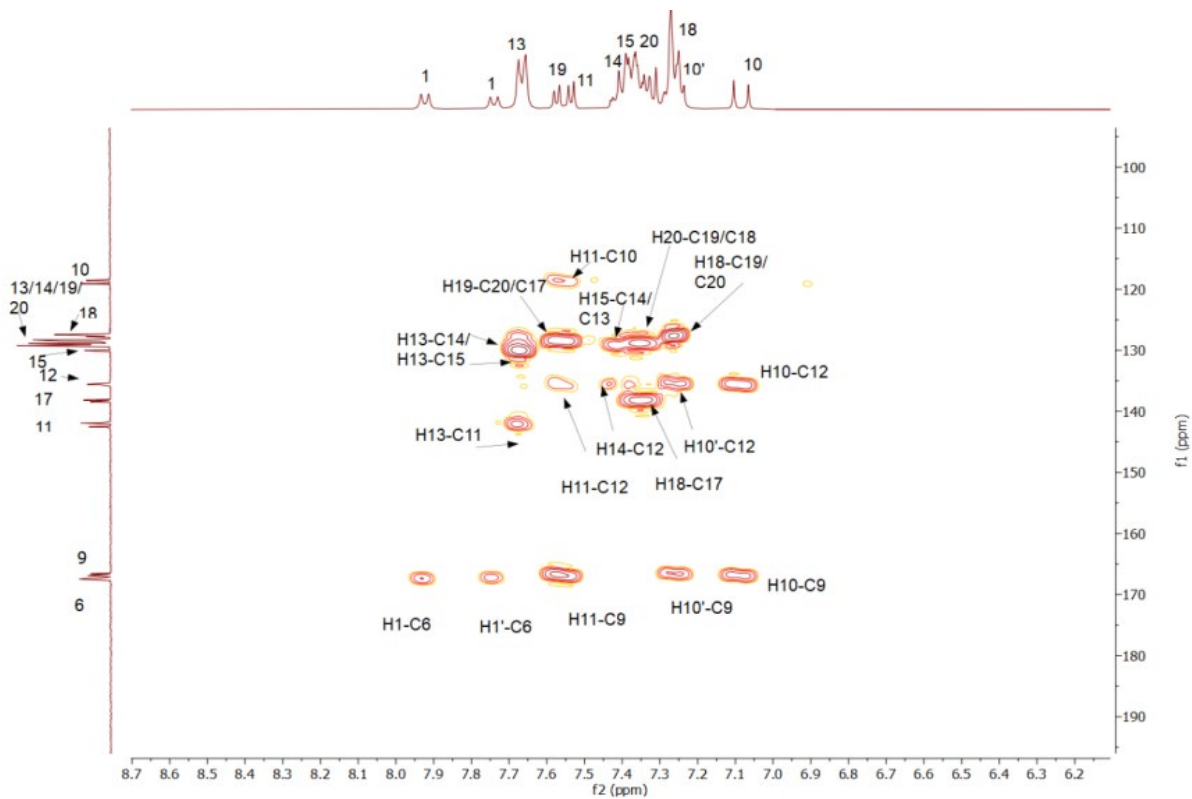
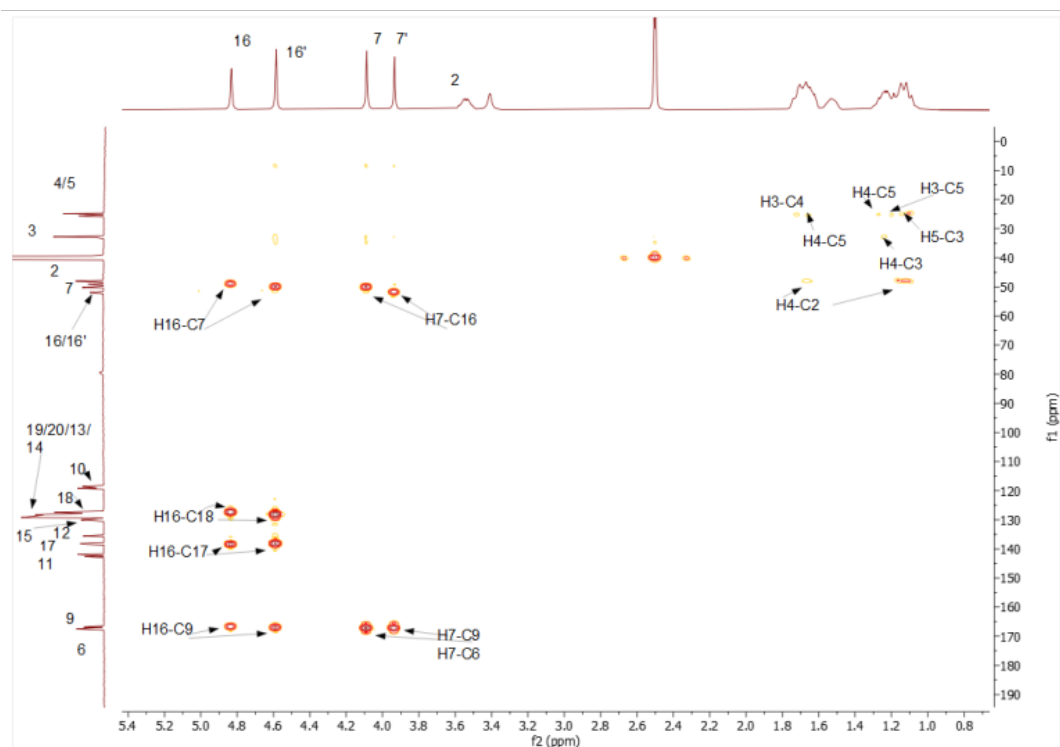
Εικόνα Π25: Φάσματα 2D-COSY-NMR του NGI25. (άνω) Αλειφατική περιοχή του NGI25 (κάτω) αρωματική περιοχή. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε DMSO-d<sub>6</sub> σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



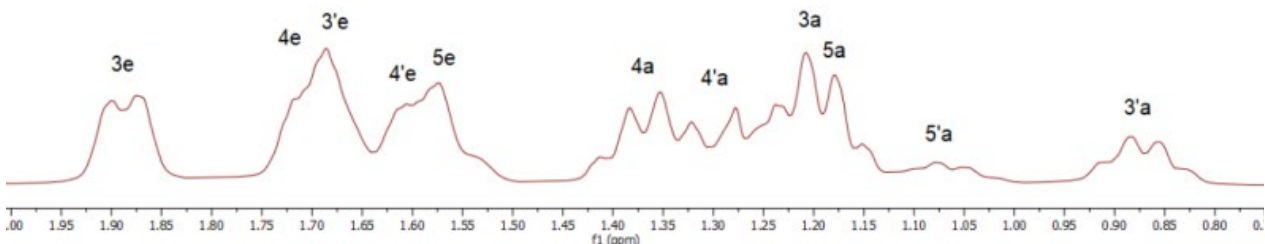
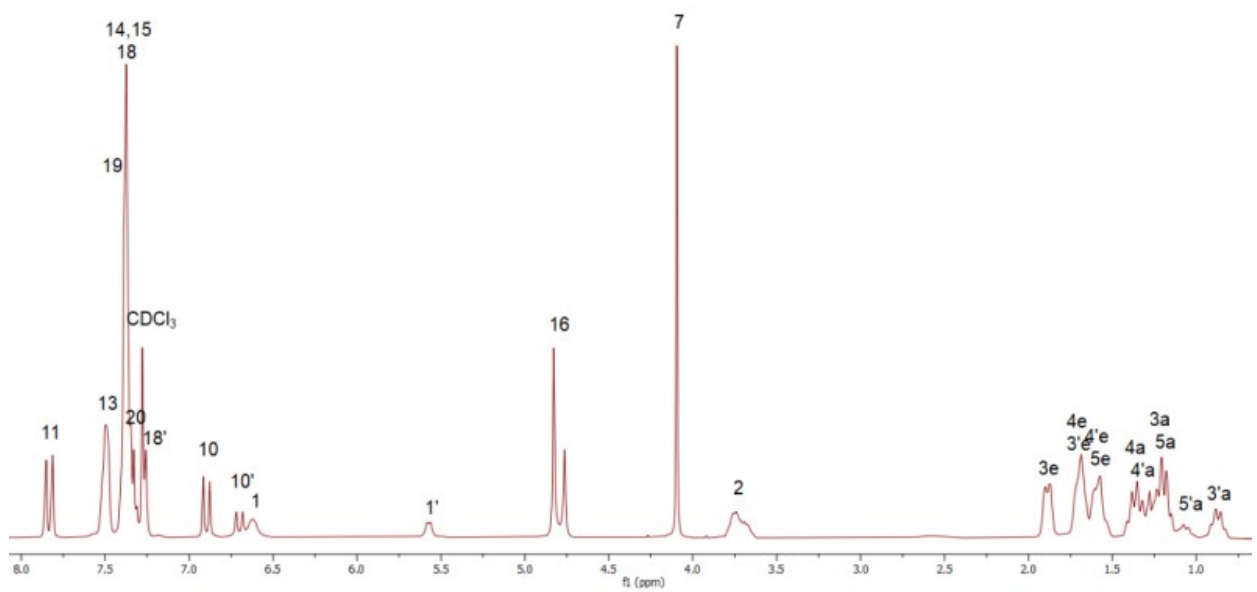
**Εικόνα Π26: Φάσματα  $^{13}\text{C}$ -NMR του NGI25. (άνω) Αλειφατική περιοχή του NGI25 (κάτω) αρωματική περιοχή. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε DMSO-d6 σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.**



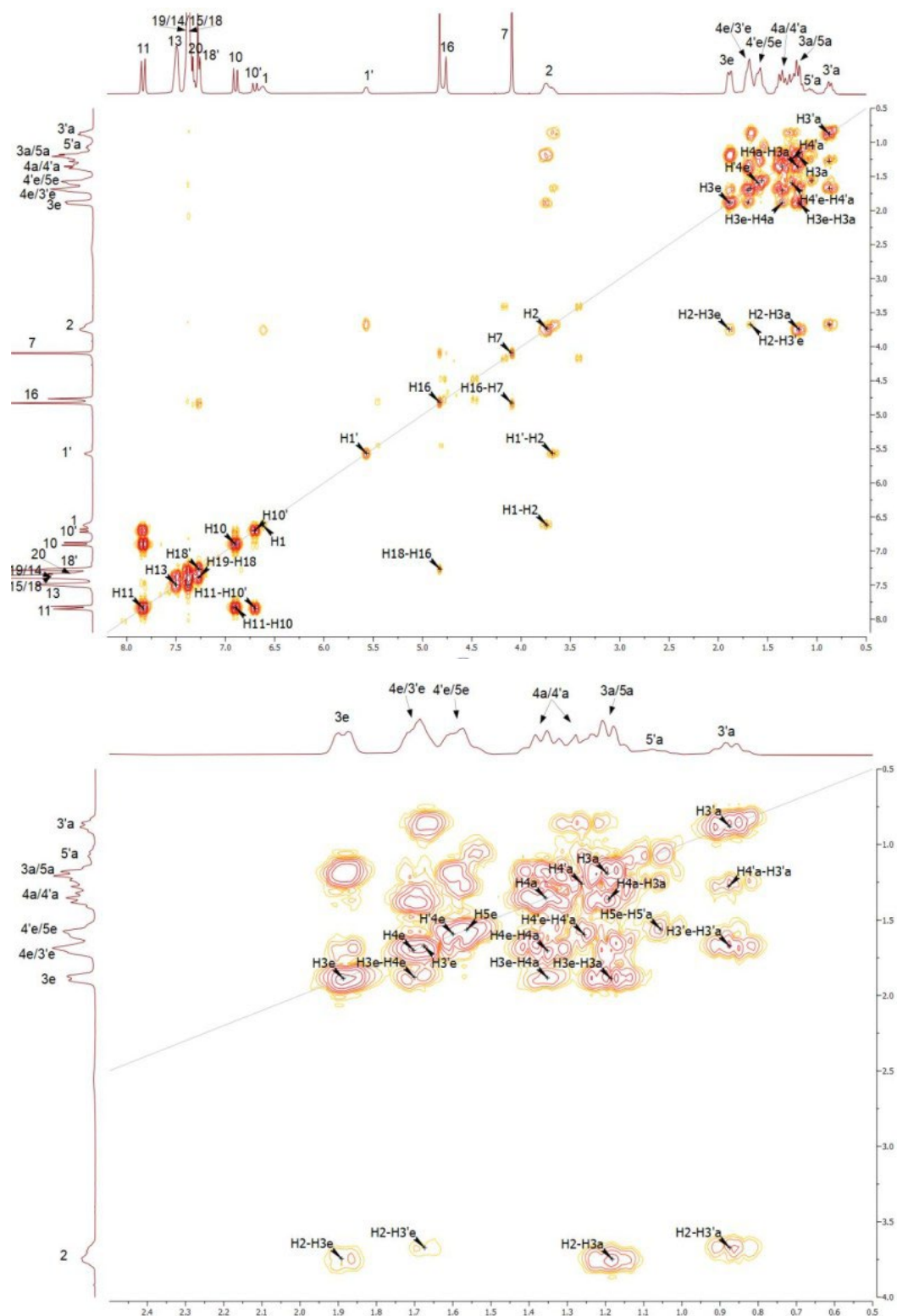
Εικόνα Π27: Φάσματα 2D-HSQC-NMR Τα φάσματα καταγράφηκαν σε DMSO-d<sub>6</sub> σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



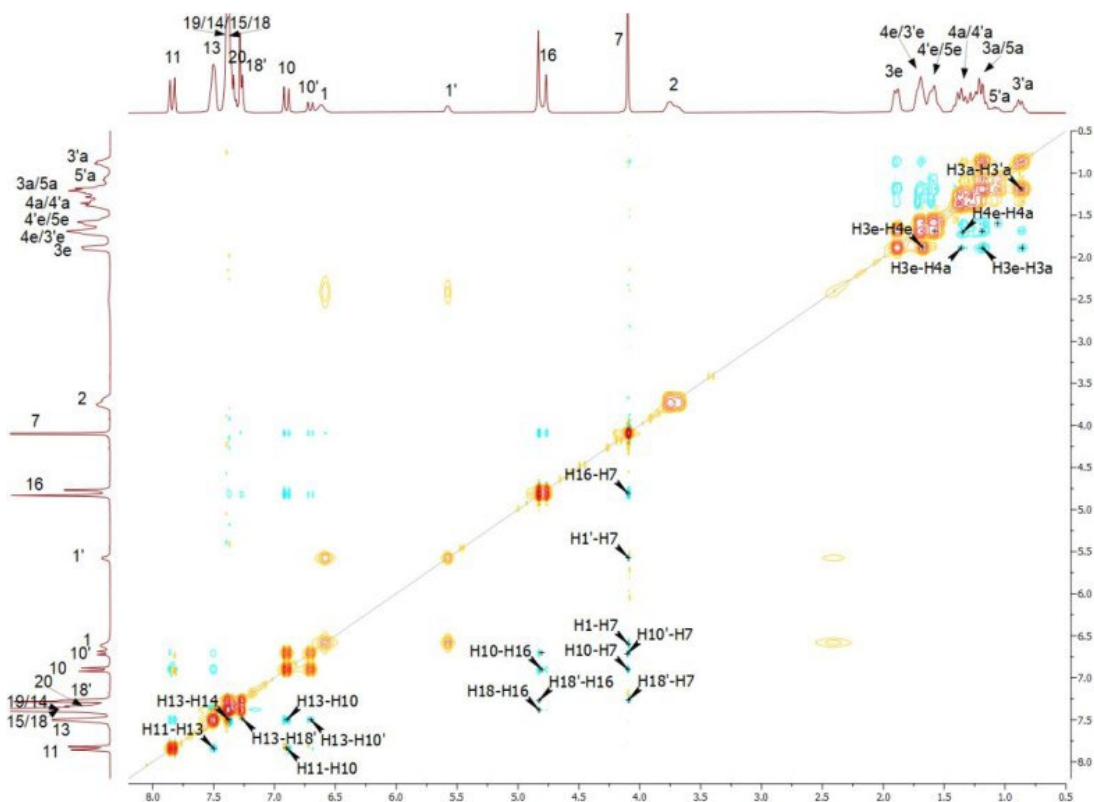
**Εικόνα Π28:** Φάσματα 2D-HMBC-NMR του NGI25. (άνω) Αλειφατική περιοχή του NGI25 (κάτω) αρωματική περιοχή. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε DMSO-d<sub>6</sub> σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



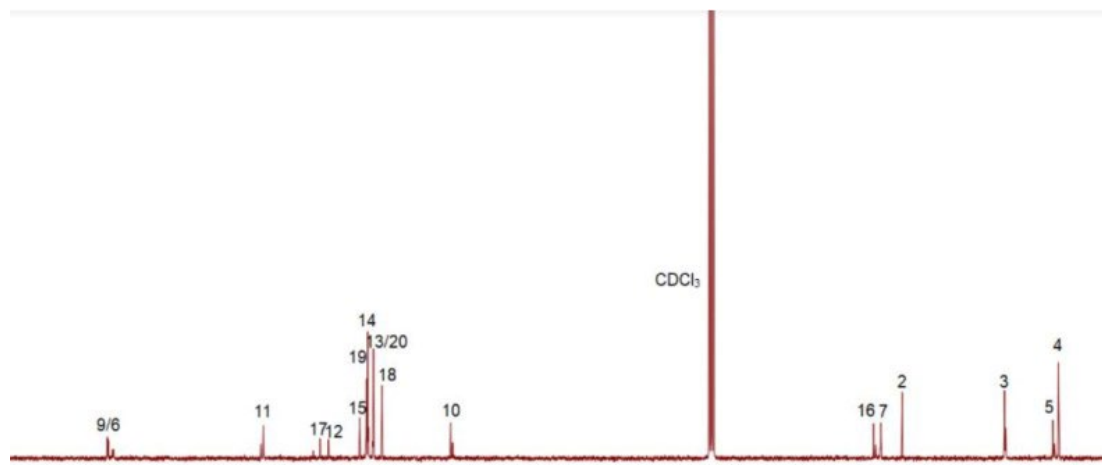
**Εικόνα Π29: Φάσμα 1H-NMR του NGI25. (άνω) Πλήρες φάσμα ου NGI25. (κάτω) αλειφατική περιοχή**  
 Τα φάσματα καταγράφηκαν σε CDCl<sub>3</sub> σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



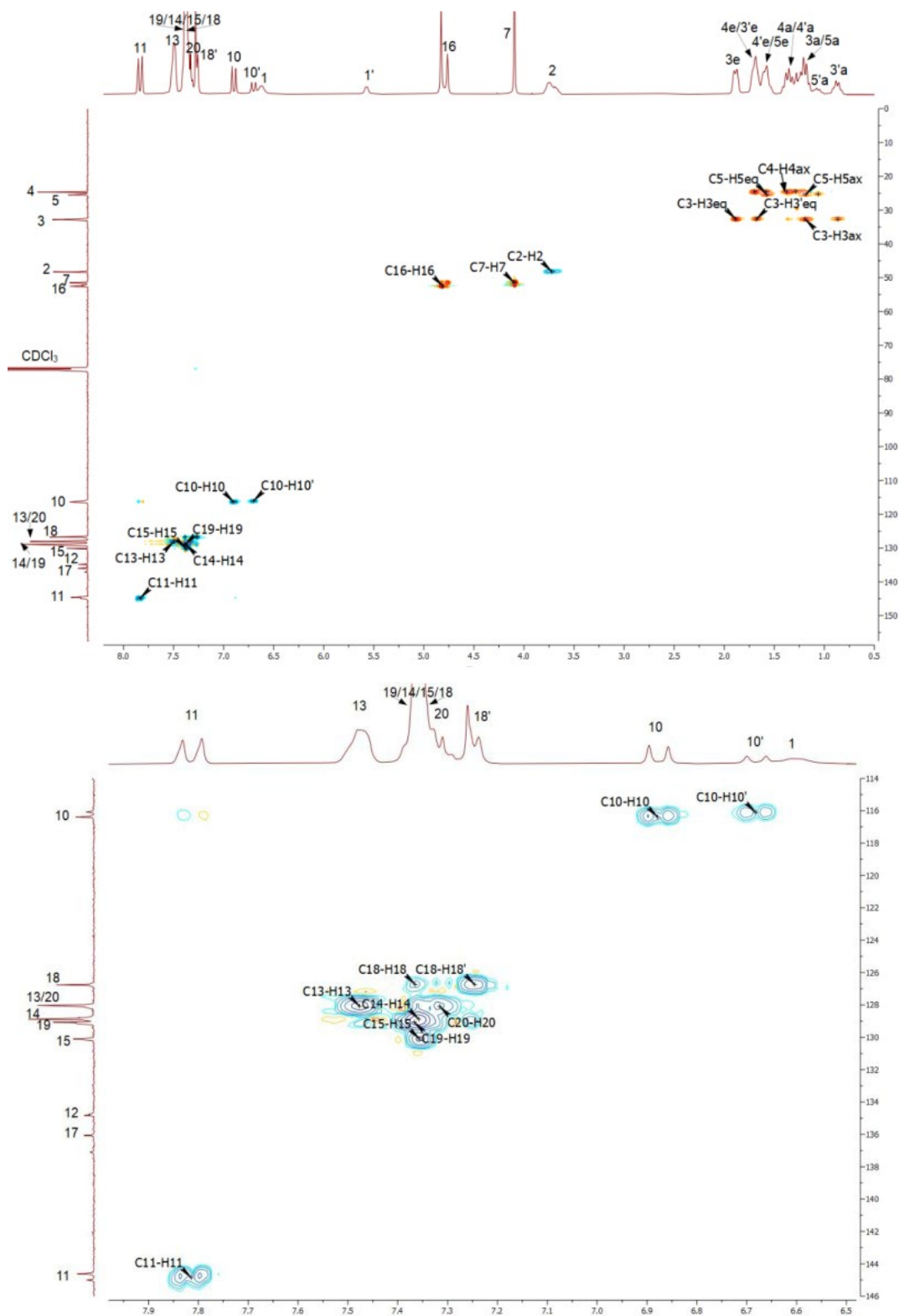
Εικόνα Π30: Φάσμα 2D-COSY-NMR του NIG25. (άνω) Αρωματική περιοχή του NIG25. (κάτω) αλειφατική περιοχή Τα φάσματα καταγράφηκαν σε  $\text{CDCl}_3$  σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



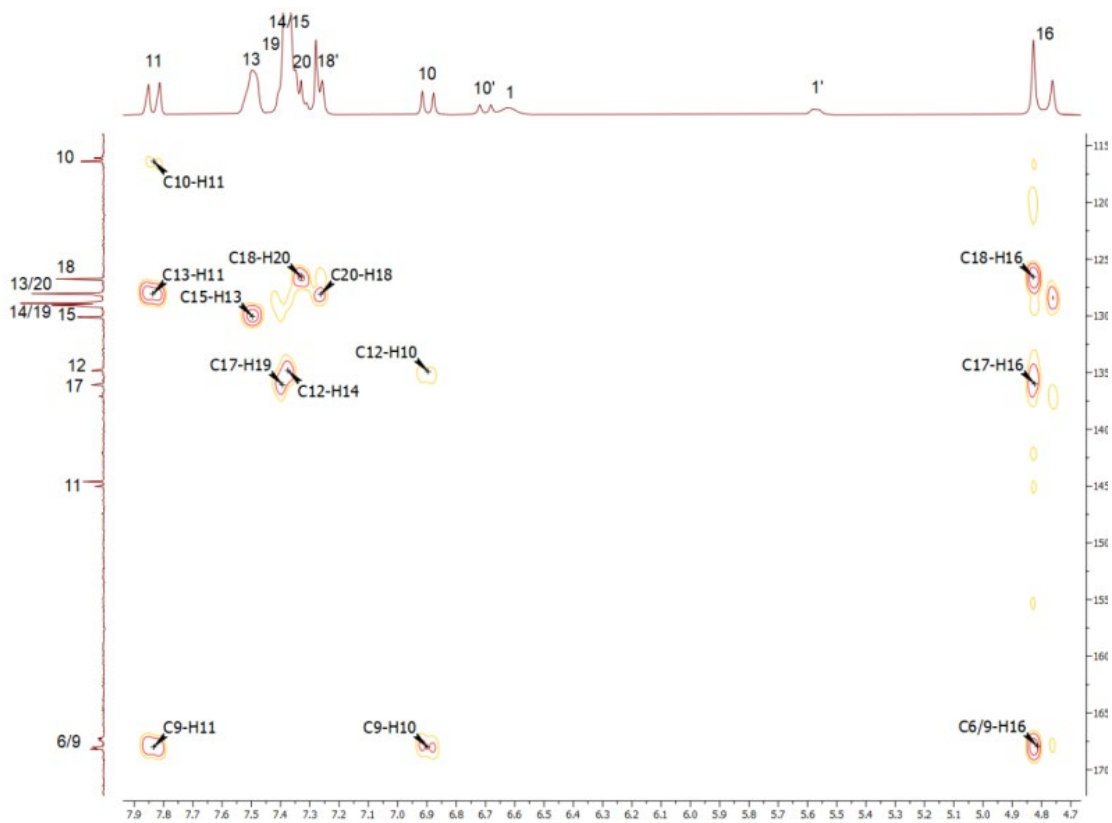
**Εικόνα Π31: Φάσμα 2D-NOESY-NMR του NGI25. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε  $\text{CDCl}_3$  σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.**



**Εικόνα Π32: Φάσμα  $^{13}\text{C}$ -NMR του NGI25. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε  $\text{CDCl}_3$  σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.**



Εικόνα Π33: Φάσμα 2D-HSQC-NMR του NGI25. (άνω) Πλήρες φάσμα ου NGI25. (κάτω) αρωματική περιοχή Τα φάσματα καταγράφηκαν σε CDCl<sub>3</sub> σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



**Εικόνα Π34: Φάσμα 2D-HMBC-NMR του NGI25. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε  $\text{CDCl}_3$  σε φασματογράφο Bruker AC 400 MHz σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.**

## ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Τίτλος δημοσίευσης:

Georgiou, Nikitas, Niki Gouleni, Eleni Chontzopoulou, George S. Skoufas, Anastasios Gkionis, Demeter Tzeli, Stamatia Vassiliou, and Thomas Mavromoustakos. **2023**. “Structure Assignment, Conformational Properties and Discovery of Potential Targets of the Ugi Cinnamic Adduct NGI25.” *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 41 (4), 1253–1266. [\[\[CrossRef\]\]](#)

## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Gravallesse, E.M.; Firestein, G.S. Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* **2023**, *388*, 1919–1920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Hou, X.; Hao, E.; Qin, J.; Wei, J.; Jiao, Y.; Yi, X.; Huang, L.; Xie, J.; Luo, H.; Zhang, Z.; et al. Prediction and analysis of chemical composition, pharmacological action and quality marker (Q-marker) of cinnamon. *Chin. Herb. Med.* **2018**, *49*, 20–34.
3. Feng, L.S.; Cheng, J.B.; Su, W.Q.; Li, H.Z.; Xiao, T.; Chen, D.A.; Zhang, Z.L. Cinnamic acid hybrids as anticancer agents: A mini-review. *Arch. Pharm.* **2022**, *355*, e2200052. [[CrossRef](#)]
4. Hussein, M.A.; Abdulrazzaq, M.H. The Protective Effect of Cinnamic Acid against Ulcerative Colitis in Mice. *Int. J. Drug Deliv. Technol.* **2023**, *13*, 143–149. [[CrossRef](#)]
5. Huang, Z.; Pang, D.; Liao, S.; Zou, Y.; Zhou, P.; Li, E.; Wang, W. Synergistic effects of cinnamaldehyde and cinnamic acid in cinnamon essential oil against *S. pullorum*. *Ind. Crops Prod.* **2021**, *162*, 113296. [[CrossRef](#)]
6. Anlar, H.G.; Bacanlı, M.; Çal, T.; Aydın, S.; Arı, N.; Ündeğer Bucurgat, Ü.; Başaran, A.A.; Başaran, A.N. Effects of cinnamic acid on complications of diabetes. *Turk. J. Med. Sci.* **2018**, *48*, 168–177. [[CrossRef](#)]
7. Olawale, H.O.; Aniekeme, E.E.; Arthur, J.S.; Taiwo, E.A. Evaluation of Antioxidant Activity of Cinnamic Acid and Some of its Derivatives. *Eur. Chem. Bull.* **2019**, *8*, 224–226. [[CrossRef](#)]
8. Meirelles, L.E.F.; Souza, M.V.F.; Carobeli, L.R.; Morelli, F.; Mari, N.L.; Damke, E.; Shinobu Mesquita, C.S.; Teixeira, J.J.V.; Consolaro, M.E.L.; Silva, V. Combination of Conventional Drugs with Biocompounds Derived from Cinnamic Acid: A Promising Option for Breast Cancer Therapy. *Biomedicines* **2023**, *11*, 275. [[CrossRef](#)]
9. Zhu, B.; Shang, B.; Li, Y.; Zhen, Y. Inhibition of histone deacetylases by trans-cinnamic acid and its antitumor effect against colon cancer xenografts in athymic mice. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *13*, 4159–4166. [[CrossRef](#)]
10. Yen, G.-C.; Chen, Y.-L.; Sun, F.-M.; Chiang, Y.-L.; Lu, S.-H.; Weng, C.-J. A comparative study on the effectiveness of cis- and trans-form of cinnamic acid treatments for inhibiting invasive activity of human lung adenocarcinoma cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2011**, *44*, 281–287. [[CrossRef](#)]
11. Imai, M.; Yokoe, H.; Tsubuki, M.; Takahashi, N. Growth Inhibition of Human Breast and Prostate Cancer Cells by Cinnamic Acid Derivatives and Their Mechanism of Action. *Biol. Pharm. Bull.* **2019**, *42*, 1134–1139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Yenigül, M.; Akçok, I.; Gencer Akçok, E.B. Ethacrynic acid and cinnamic acid combination exhibits selective anticancer effects on K562 chronic myeloid leukemia cells. *Mol. Biol. Rep.* **2022**, *49*, 7521–7530. [[CrossRef](#)]
13. Adisakwattana, S. Cinnamic Acid and Its Derivatives: Mechanisms for Prevention and Management of Diabetes and Its Complications. *Nutrients* **2017**, *9*, 163. [[CrossRef](#)]
14. Amaliyah, N.; Sarjono, P.R.; Ngadiwiyan, N.; Ismiyanto, I. Antibacterial Activity of Cinnamic Acid—Chitosan Encapsulation. *J. Kim. Sains Apl.* **2018**, *21*, 8–12. [[CrossRef](#)]
15. He, X.; Wang, L.; Xia, B.; Cao, X.; Hu, N.; Huang, J.; Yi, Y. Antifungal effect of cinnamic acid and induced resistance of cinnamic acid-protocatechuic acid-CaCl<sub>2</sub>-NaCl-pullulan composite preservative to *Trichoderma harzianum* in postharvest *Hypsizygus marmoreus*. *LWT* **2023**, *184*, 11. [[CrossRef](#)]
16. Zhang, Y.; Wei, J.; Guo, H.; Niu, C.; Yuan, Y.; Yue, T. Phenotypic and Transcriptomic Analyses Reveal the Cell Membrane Damage of *Pseudomonas fragi* Induced by Cinnamic Acid. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 796754. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. De Vita, D.; Simonetti, G.; Pandolfi, F.; Costi, R.; Di Santo, R.; D’Auria, F.D.; Scipione, L. Exploring the anti-biofilm activity of cinnamic acid derivatives in *Candida albicans*. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 5931–5935. [[CrossRef](#)]
18. Li, C. *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2017.
19. Ruwizhi, N.; Aderibigbe, B.A. Cinnamic Acid Derivatives and Their Biological Efficacy. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5712. [[CrossRef](#)]
20. Borges, R.S.; Ortiz, B.L.S.; Pereira, A.C.M.; Keita, H.; Carvalho, J.C.T. *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *229*, 29–45. [[CrossRef](#)]
21. Salehi, B.; Sharopov, F.; Boyunegmez Tumer, T.; Ozleyen, A.; Rodríguez-Pérez, C.; Ezzat, S.M.; Azzini, E.; Hosseinabadi, T.; Butnariu, M.; Sarac, I.; et al. *Symphytum* Species: A Comprehensive Review on Chemical Composition, Food Applications and Phytopharmacology. *Molecules* **2019**, *24*, 2272. [[CrossRef](#)]
22. Zhang, Q.; Li, S.; Yu, Y.; Zhu, Y.; Tong, R. A Mini-Review of Diagnostic and Therapeutic Nano-Tools for Pancreatitis. *Int. J. Nanomed.* **2022**, *17*, 4367–4381. [[CrossRef](#)]
23. Ammer-Herrmenau, C.; Asendorf, T.; Beyer, G.; Buchholz, S.M.; Cameron, S.; Damm, M.; Frost, F.; Henker, R.; Jaster, R.; Phillip, V.; et al. Study protocol P-MAPS: Microbiome as predictor of severity in acute pancreatitis—a prospective multicentre translational study. *BMC Gastroenterol.* **2021**, *21*, 304. [[CrossRef](#)]
24. Wydmanski, J.; Polanowski, P.; Tukiendorf, A.; Maslyk, B. Radiation-induced

- injury of the exocrine pancreas after chemoradio-therapy for gastric cancer. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **2016**, 118, 535–539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Abozaid, O.A.R.; Moawed, F.S.M.; Ahmed, E.S.A.; Ibrahim, Z.A. Cinnamic acid nanoparticles modulate redox signal and inflammatory response in gamma irradiated rats suffering from acute pancreatitis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2020**, 1866, 165904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  26. Heneghan, M.A.; Mcfarlane, I.G. Current and novel immunosuppressive therapy for autoimmune hepatitis (p7–13). *Hepatology* **2010**, 35, 7–13. [[CrossRef](#)]
  27. Stan, S.D.; Singh, S.V.; Brand, R.E. Chemoprevention strategies for pancreatic cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2010**, 7, 347–356. [[CrossRef](#)]
  28. Liu, T.C.; Stappenbeck, T.S. Genetics and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Annu. Rev. Pathol.* **2016**, 11, 127–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  29. Löfberg, R. Review article: Medical treatment of mild to moderately active Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2003**, 17 (Suppl. S2), 18–22. [[CrossRef](#)]
  30. Blander, J.M. A new approach for inflammatory bowel disease therapy. *Nat. Med.* **2019**, 25, 545–546. [[CrossRef](#)]
  31. Randall, C.W.; Vizuite, J.A.; Martinez, N.; Alvarez, J.J.; Garapati, K.V.; Malakouti, M.; Taboada, C.M. From historical perspectives to modern therapy: A review of current and future biological treatments for Crohn's disease. *Ther. Adv. Gastroenterol.* **2015**, 8, 143–159. [[CrossRef](#)]
  32. Crowe, J.S.; Roberts, K.J.; Carlton, T.M.; Maggiore, L.; Cubitt, M.F.; Clare, S.; Harcourt, K.; Reckless, J.; MacDonald, T.T.; Ray, K.P.; et al. Preclinical Development of a Novel, Orally-Administered Anti-Tumour Necrosis Factor Domain Antibody for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Sci. Rep.* **2018**, 8, 4941. [[CrossRef](#)]
  33. Firestein, G.S.; McInnes, I.B. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity* **2017**, 46, 183–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  34. Smolen, J.S.; Aletaha, D.; McInnes, I.B. Rheumatoid arthritis. *Lancet* **2016**, 388, 2023–2038. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  35. Bustamante, M.F.; Garcia-Carbonell, R.; Whisenant, K.D.; Guma, M. Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **2017**, 19, 110. [[CrossRef](#)]
  36. Ak, P.P.; Kalden, J.R. Advances in rheumatology: New targeted therapeutics. *Arthritis Res. Ther.* **2011**, 13 (Suppl. S1), S5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  37. Burmester, G.R.; Pope, J.E. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. *Lancet* **2017**, 389, 2338–2348. [[CrossRef](#)]
  38. Hajishengallis, G.; Chavakis, T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nat. Rev. Immunol.* **2021**,

- 
- 21, 426–440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Kim, P.D.; Xia-Juan, X.; Crump, K.E.; Abe, T.; Hajishengallis, G.; Sahingur, S.E. Toll-Like Receptor 9-Mediated Inflammation Triggers Alveolar Bone Loss in Experimental Murine Periodontitis. *Infect. Immun.* **2015**, *83*, 2992–3002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Murakami, S.; Mealey, B.L.; Mariotti, A.; Chapple, I.L.C. Dental plaque-induced gingival conditions. *J. Periodontol.* **2018**, *89* (Suppl. S1), S17–S27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Yilmaz, S.; Sova, M.; Ergün, S. Antimicrobial activity of trans-cinnamic acid and commonly used antibiotics against important fish pathogens and nonpathogenic isolates. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *125*, 1714–1727. [[CrossRef](#)]
42. Lucas-González, R.; Yilmaz, B.; Mousavi Khaneghah, A.; Hano, C.; Shariati, M.A.; Bangar, S.P.; Goksen, G.; Dhama, K.; Lorenzo, J.M. Cinnamon: An antimicrobial ingredient for active packaging. *Food Packag. Shelf Life* **2023**, *35*, 101026. [[CrossRef](#)]
43. Howden, B.P.; Giulieri, S.G.; Wong Fok Lung, T.; Baines, S.L.; Sharkey, L.K.; Lee, J.Y.H.; Hachani, A.; Monk, I.R.; Stinear, T.P. *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2023**, *21*, 380–395. [[CrossRef](#)]
44. Viçosa, G.N.; Botta, C.; Ferrocino, I.; Bertolino, M.; Ventura, M.; Nero, L.A.; Cocolin, L. *Staphylococcus aureus* undergoes major transcriptional reorganization during growth with *Enterococcus faecalis* in milk. *Food Microbiol.* **2018**, *73*, 17–28. [[CrossRef](#)]
45. Nikolic, P.; Mudgil, P. The Cell Wall, Cell Membrane and Virulence Factors of *Staphylococcus aureus* and Their Role in Antibiotic Resistance. *Microorganisms* **2023**, *11*, 259. [[CrossRef](#)]
46. Azam, M.W.; Khan, A.U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discov. Today* **2019**, *24*, 350–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Qin, S.; Xiao, W.; Zhou, C.; Pu, Q.; Deng, X.; Lan, L.; Liang, H.; Song, X.; Wu, M. *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, *7*, 199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Tamma, P.D.; Aitken, S.L.; Bonomo, R.A.; Mathers, A.J.; van Duin, D.; Clancy, C.J. Infectious Diseases Society of America 2022 Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-P. *aeruginosa*). *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2022**, *75*, 187–212. [[CrossRef](#)]
49. Fatemeh, F.; Kambiz, D.; Jafar, K.; Shohreh Afshar, Y. Silver resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from burn patients. *Immunopathol. Persa* **2023**, *9*, 39498. [[CrossRef](#)]

50. Jault, P.; Leclerc, T.; Jennes, S.; Pirnay, J.P.; Que, Y.A.; Resch, G.; Rousseau, A.F.; Ravat, F.; Carsin, H.; Le Floch, R.; et al. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): A randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *Lancet. Infect. Dis.* **2019**, *19*, 35–45. [[CrossRef](#)]
51. Rahim, K.; Saleha, S.; Zhu, X.; Huo, L.; Basit, A.; Franco, O.L. Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. *Microb. Ecol.* **2017**, *73*, 710–721. [[CrossRef](#)]
52. Ercolini, D.; Casaburi, A.; Nasi, A.; Ferrocino, I.; Di Monaco, R.; Ferranti, P.; Mauriello, G.; Villani, F. Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the same overall behaviour as meat spoilers. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *142*, 120–131. [[CrossRef](#)]
53. Damdam, A.N.; Alzahrani, A.; Salah, L.; Salama, K.N. Effects of UV-C Irradiation and Vacuum Sealing on the Shelf-Life of Beef, Chicken and Salmon Fillets. *Foods* **2023**, *12*, 606. [[CrossRef](#)]
54. Quintieri, L.; Fanelli, F.; Zühlke, D.; Caputo, L.; Logrieco, A.F.; Albrecht, D.; Riedel, K. Biofilm and Pathogenesis-Related Proteins in the Foodborne *P. fluorescens* ITEM 17298 with Distinctive Phenotypes During Cold Storage. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Guo, J.; Gao, Z.; Li, G.; Fu, F.; Shan, Y. Antimicrobial and antibiofilm efficacy and mechanism of essential oil from Citrus Changshan-huyou *Y. B. chang* against *Listeria monocytogenes*. *Food Control* **2019**, *105*, 256–264. [[CrossRef](#)]
56. Niu, J.; Shang, M.; Li, X.; Sang, S.; Chen, L.; Long, J.; Jiao, A.; Ji, H.; Jin, Z.; Qiu, C. Health benefits, mechanisms of interaction with food components, and delivery of tea polyphenols: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2024**, *64*, 12487–12499. [[CrossRef](#)]
57. Salci, T.P.; Negri, M.; Abadio, A.K.R.; Svidzinski, T.I.E.; Kioshima, É.S. Targeting *Candida* spp. To develop antifungal agents. *Drug Discov. Today* **2018**, *23*, 802–814. [[CrossRef](#)]
58. Danion, F.; Duréault, A.; Gautier, C.; Senechal, A.; Persat, F.; Bougnoux, M.E.; Givel, C.; Couderc, L.J.; Lortholary, O.; Garcia-Hermoso, D.; et al. Emergence of azole resistant-*Aspergillus fumigatus* infections during STAT3-deficiency. *J. Med. Microbiol.* **2020**, *69*, 844–849. [[CrossRef](#)]
59. Lovly, C.M. Expanding Horizons for Treatment of Early-Stage Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *386*, 2050–2051. [[CrossRef](#)]
60. Coussens, N.P.; Braisted, J.C.; Peryea, T.; Sittampalam, G.S.; Simeonov, A.; Hall, M.D. Small-Molecule Screens: A Gateway to Cancer Therapeutic Agents with Case Studies of Food and Drug Administration-Approved Drugs. *Pharmacol. Rev.* **2017**, *69*, 479–496. [[CrossRef](#)]
61. Garraway, L.A.; Jänne, P.A. Circumventing cancer drug resistance in the era of personalized medicine. *Cancer Discov.* **2012**, *2*, 214–226. [[CrossRef](#)]

62. Giaquinto, A.N.; Sung, H.; Newman, L.A.; Freedman, R.A.; Smith, R.A.; Star, J.; Jemal, A.; Siegel, R.L. Breast cancer statistics 2024. *CA Cancer J. Clin.* **2024**, *74*, 477–495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [[CrossRef](#)]
64. Bray, F.; Laversanne, M.; Weiderpass, E.; Soerjomataram, I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer* **2021**, *127*, 3029–3030. [[CrossRef](#)]
65. Islam, M.R.; Akash, S.; Rahman, M.M.; Nowrin, F.T.; Akter, T.; Shohag, S.; Rauf, A.; Aljohani, A.S.M.; Simal-Gandara, J. Colon cancer and colorectal cancer: Prevention and treatment by potential natural products. *Chem.-Biol. Interact.* **2022**, *368*, 110170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Xia, C.; Dong, X.; Li, H.; Cao, M.; Sun, D.; He, S.; Yang, F.; Yan, X.; Zhang, S.; Li, N.; et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: Profiles, trends, and determinants. *Chin. Med. J.* **2022**, *135*, 584–590. [[CrossRef](#)]
67. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J. Clin.* **2022**, *72*, 7–33. [[CrossRef](#)]
68. Cheng, T.; Shan, G.; Yang, H.; Gu, J.; Lu, C.; Xu, F.; Ge, D. Development of a ferroptosis-based model to predict prognosis, tumor microenvironment, and drug response for lung adenocarcinoma with weighted genes co-expression network analysis. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 1072589. [[CrossRef](#)]
69. Chen, W.; Zheng, R.; Baade, P.D.; Zhang, S.; Zeng, H.; Bray, F.; Jemal, A.; Yu, X.Q.; He, J. Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J. Clin.* **2016**, *66*, 115–132. [[CrossRef](#)]
70. Zhao, J.; Guo, C.; Ma, Z.; Liu, H.; Yang, C.; Li, S. Identification of a novel gene expression signature associated with overall survival in patients with lung adenocarcinoma: A comprehensive analysis based on TCGA and GEO databases. *Lung Cancer* **2020**, *149*, 90–96. [[CrossRef](#)]
71. Wu, P.; Zheng, Y.; Wang, Y.; Wang, Y.; Liang, N. Development and validation of a robust immune-related prognostic signature in early-stage lung adenocarcinoma. *J. Transl. Med.* **2020**, *18*, 380. [[CrossRef](#)]
72. Isoda, K.; Nozawa, T.; Taira, Y.; Taira, I.; Shimizu, Y.; Ishida, I. Effects of surface charge and palladium on hepatic and kidney injury induced by polystyrene nanoparticles co-administered to mice with paraquat and cisplatin. *Die Pharm.* **2018**, *73*, 165–168. [[CrossRef](#)]
73. Kilic, K.; Sakat, M.S.; Akdemir, F.N.E.; Yildirim, S.; Saglam, Y.S.; Askin, S. Protective effect of gallic acid against cisplatin-induced ototoxicity in rats. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* **2019**, *85*, 267–274. [[CrossRef](#)]

74. Fillon, M. Rates of advanced prostate cancer continue to increase. *CA Cancer J. Clin.* **2020**, 70, 427–429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Rawla, P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J. Oncol.* **2019**, 10, 63–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Mohile, S.G.; Mustian, K.; Bylow, K.; Hall, W.; Dale, W. Management of complications of androgen deprivation therapy in the older man. *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* **2009**, 70, 235–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Minciaccchi, V.R.; Kumar, R.; Krause, D.S. Chronic Myeloid Leukemia: A Model Disease of the Past, Present and Future. *Cells* **2021**, 10, 117. [[CrossRef](#)]
78. Deininger, M.W.; Shah, N.P.; Altman, J.K.; Berman, E.; Bhatia, R.; Bhatnagar, B.; DeAngelo, D.J.; Gotlib, J.; Hobbs, G.; Maness, L.; et al. Chronic Myeloid Leukemia, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN* **2020**, 18, 1385–1415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Shadman, M. Diagnosis and Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia: A Review. *JAMA* **2023**, 329, 918–932. [[CrossRef](#)]
80. The, L. Diabetes: An ounce of prevention is worth a pound of cure. *Lancet* **2015**, 386, 932. [[CrossRef](#)]
81. Armstrong, D.G.; Tan, T.W.; Boulton, A.J.M.; Bus, S.A. Diabetic Foot Ulcers: A Review. *JAMA* **2023**, 330, 62–75. [[CrossRef](#)]
82. Gray, S.P.; Jandeleit-Dahm, K. The pathobiology of diabetic vascular complications—Cardiovascular and kidney disease. *J. Mol. Med.* **2014**, 92, 441–452. [[CrossRef](#)]
83. Thapar, A.; Eyre, O.; Patel, V.; Brent, D. Depression in young people. *Lancet* **2022**, 400, 617–631. [[CrossRef](#)]
84. Dean, J.; Keshavan, M. The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian J. Psychiatr.* **2017**, 27, 101–111. [[CrossRef](#)]
85. Ishtiak-Ahmed, K.; Musliner, K.L.; Christensen, K.S.; Mortensen, E.L.; Nierenberg, A.A.; Gasse, C. Real-World Evidence on Clinical Outcomes of Commonly Used Antidepressants in Older Adults Initiating Antidepressants for Depression: A Nationwide Cohort Study in Denmark. *Am. J. Psychiatry* **2024**, 181, 47–56. [[CrossRef](#)]
86. Fagiolini, A.; Florea, I.; Loft, H.; Christensen, M.C. Effectiveness of Vortioxetine on Emotional Blunting in Patients with Major Depressive Disorder with inadequate response to SSRI/SNRI treatment. *J. Affect. Disord.* **2021**, 283, 472–479. [[CrossRef](#)]
87. Subedi, L.; Gaire, B.P. Neuroprotective Effects of Curcumin in Cerebral Ischemia: Cellular and Molecular Mechanisms. *ACS Chem. Neurosci.* **2021**, 12, 2562–2572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Powell-Wiley, T.M.; Poirier, P.; Burke, L.E.; Després, J.P.; Gordon-Larsen, P.; Lavie, C.J.; Lear, S.A.; Ndumele, C.E.; Neeland, I.J.; Sanders, P.; et al. Obesity

- and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Circulation* **2021**, 143, e984–e1010. [[CrossRef](#)]
89. von Mutius, E.; Smits, H.H. Primary prevention of asthma: From risk and protective factors to targeted strategies for prevention. *Lancet* **2020**, 396, 854–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  90. Pakkasela, J.; Ilmarinen, P.; Honkamäki, J.; Tuomisto, L.E.; Andersén, H.; Piirilä, P.; Hisinger-Mölkänen, H.; Sovijärvi, A.; Backman, H.; Lundbäck, B.; et al. Age-specific incidence of allergic and non-allergic asthma. *BMC Pulm. Med.* **2020**, 20, 9. [[CrossRef](#)]
  91. Pierangeli, I.; Nieuwenhuijsen, M.J.; Cirach, M.; Rojas-Rueda, D. Health equity and burden of childhood asthma—Related to air pollution in Barcelona. *Environ. Res.* **2020**, 186, 109067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  92. Haidar, A.L.S.; Munaf, H.Z. The Possible Protective Effect of Cinnamic Acid on Ovalbumin-Induced Asthma in Mice. *Iraqi J. Pharm. Sci.* **2023**, 32, 133–138. [[CrossRef](#)]
  93. Rychen, G.; Aquilina, G.; Azimonti, G.; Bampidis, V.; Bastos, M.L.; Bories, G.; Cocconcelli, P.S.; Flachowsky, G.; Gropp, J.; Kolar, B.; et al. Safety and efficacy of aryl-substituted primary alcohol, aldehyde, acid, ester and acetal derivatives belonging to chemical group 22 when used as flavourings for all animal species. *EFSA J. Eur. Food Saf. Auth.* **2017**, 15, e04672. [[CrossRef](#)]
  94. Olivieri, D.; Verboni, M.; Benedetti, S.; Paderni, D.; Carfagna, C.; Duranti, A.; Lucarini, S. New cinnamic acid sugar esters as potential UVB filters: Synthesis, cytotoxicity, and physicochemical properties. *Carbohydr. Res.* **2025**, 550, 109405. [[CrossRef](#)]
  95. Kong, Y.H.; Jo, Y.O.; Cho, C.W.; Son, D.; Park, S.; Rho, J.; Choi, S.Y. Inhibitory effects of cinnamic acid on melanin biosynthesis in skin. *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, 31, 946–948. [[CrossRef](#)]
  96. Niero, E.L.; Machado-Santelli, G.M. Cinnamic acid induces apoptotic cell death and cytoskeleton disruption in human melanoma cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **2013**, 32, 31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  97. Alam, M.A.; Subhan, N.; Hossain, H.; Hossain, M.; Reza, H.M.; Rahman, M.M.; Ullah, M.O. Hydroxycinnamic acid derivatives: A potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutr. Metab.* **2016**, 13, 27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  98. Θ. Μαυρομούστακος, Α. Τζάκος, Γ. Σπυρούλιας, Ε. Μικρός, Α. Κολοκούρης, Κ. Παπακωνσταντίνου, Ι. Γεροθανάσης, Ι. Ματσούκας. Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός. Εκδόσεις Συμμετρία. 2018, ISBN:978-960-266-504-6, Αθήνα **2018**.
  99. 100.Ε. Χοντζοπούλου, Σ. Κυριακίδη, Π. Ζουμπουλάκης, Θ. Μαυρομούστακος. Αρχές Υπολογιστικής Χημείας Εκδόσεις Κάλλιπος, Πρόγραμμα Ανάπτυξης **2021-2025**.

100. Jieping Zhu, H. B. (2005). Multicomponent reactions. Wiley.
101. Cioc, R. C., Ruijter, E., & Orru, R. V. A. (2014). Multicomponent reactions: Advanced tools for sustainable organic synthesis. *Green Chemistry*, 16(6), 2958–2975. [[CrossRef](#)]
102. Dömling, A., Wang, W., & Wang, K. (2012). Chemistry and biology of multicomponent reactions. *Chemical Reviews*, 112(6), 3083–3135. [[CrossRef](#)]
103. Hulme, C., & Gore, V. (2003). “Multi-component reactions: Emerging chemistry in drug discovery” ‘from xylocain to crixivan’. *Current Medicinal Chemistry*, 092986703336860010(1), 51–80. [[CrossRef](#)]
104. Ruijter, E., & Orru, R. V. A. (2013). Multicomponent reactions- Opportunities for the pharmaceutical industry . *Drug Discovery Today. Technologies*, 10(1), e15–e20. [[CrossRef](#)]
105. Theato, P. (2015). Multi-component and sequential reactions in polymer synthesis- Advances in polymer science. Springer International Publishing.
106. Toure, B. B., & Hall, D. G. (2009). Natural product synthesis using multi-component reaction strategies. *Chemical Reviews*, 109(9), 4439–4486. [[CrossRef](#)]
107. Akritopoulou-Zanze, I. (2008). Isocyanide-based multicomponent reactions in drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(3), 324–331. [[CrossRef](#)]
108. Luo, J., Chen, G. S., Chen, S. J., Li, Z. D., & Liu, Y. L. (2021). Catalytic enantioselective isocyanide-based reactions: Beyond Passerini and Ugi multicomponent reactions. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 27(22), 6598–6619. [[CrossRef](#)]
109. Graebin, C. S., Ribeiro, F. V., Rogerio, K. R., & Kümmerle, A. E. (2019). Multicomponent reactions for the synthesis of bioactive compounds: A review. *Current Organic Synthesis*, 16(6), 855–899. [[CrossRef](#)]
110. Basso, A., Banfi, L., & Riva, R. (2010). A marriage of convenience: Combining the power of isocyanide based multicomponent reactions with the versatility of (hetero)norborene chemistry. *European Journal of Organic Chemistry*, 2010(10), 1831–1841. [[CrossRef](#)]
111. Dömling, A. (2006). Recent developments in isocyanide based multicomponent reactions in applied chemistry. *Chemical Reviews*, 106(1), 17–89. [[CrossRef](#)]
112. Gruppen, B., Zerfall, T., Kennzeichnung, Z., Siedepunktgleichung, E., Verbindung, E., Chloroform-Lösungen, D., Absorptionsmaxima, D., & Ekment, E. (1959). *Versammlungsberichte. Angewandte Chemie*, 71(11), 373–388. [[CrossRef](#)]
113. Fouad, M. A., Abdel-Hamid, H., & Ayoup, M. S. (2020). Two decades of recent advances of Ugi reactions: Synthetic and pharmaceutical applications. *RSC Advances*, 10(70), 42644–42681. [[CrossRef](#)]
114. Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7, 42717. [[CrossRef](#)]

115. Imtiaz, S., Muzaffar, S., & Ali, S. M. (2021). Demonstrating accuracy of the already proposed protocol for structure elucidation of cyclodextrin inclusion complexes by validation using quantitative ROESY analysis. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 100(1–2), 71–87. [\[CrossRef\]](#)
116. Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H., & Pedersen, L. G. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *Journal of Chemical Physics*, 103(19), 8577–8593. [\[CrossRef\]](#)
117. Martyna, G. J., Tobias, D. J., & Klein, M. L. (1994). Constant pressure molecular dynamics algorithms. *Journal of Chemical Physics*, 101(5), 4177–4189. [\[CrossRef\]](#)
118. Humphreys, D. D., Friesner, R. A., & Berne, B. J. (1994). A multiple-time-step molecular dynamics algorithm for macromolecules. *The Journal of Physical Chemistry*, 98(27), 6885–6892. [\[CrossRef\]](#)
119. Lyman, E., & Zuckerman, D. M. (2006). Ensemble-based convergence analysis of biomolecular trajectories. *Biophysical Journal*, 91(1), 164–172. [\[CrossRef\]](#)
120. D. E. Shaw Research. Desmond tutorial. Schroedinger. [\[CrossRef\]](#)
121. Lee, C., Yang, W., & Parr, R. G. (1988). Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review. B, Condensed Matter*, 37(2), 785–789. [\[CrossRef\]](#)
122. Becke, A. D. (1993). A new mixing of Hartree–Fock and local density functional theories. *Journal of Chemical Physics*, 98(2), 1372–1377 [\[CrossRef\]](#)
123. Curtiss, L. A., McGrath, M. P., Blaudeau, J., Davis, N. E., Binning, R. C., & Radom, L. (1995). Extension of Gaussian-2 theory to molecules containing third-row atoms Ga–Kr. *Journal of Chemical Physics*, 103(14), 6104–6113. [\[CrossRef\]](#)
124. Cossi, M., Scalmani, G., Rega, N., & Barone, V. (2002). New developments in the polarizable continuum model for quantum mechanical and classical calculations on molecules in solution. *Journal of Chemical Physics*, 117(1), 43–54. [\[CrossRef\]](#)
125. Tzeli, D., Kozielwicz, P., Zervou, M., Potamitis, C., Kokkotou, K., Rak, B., Petrou, A., Tsolaki, E., Gavalas, A., Geronikaki, A., Petsalakis, I. D., & Tsoungas, P. G. (2016). 20-Dihydroxybenzophenones and derivatives. Efficient synthesis and structure endoscopy by DFT and NMR. Credentials as potent anti-inflammatory agents. *ChemistrySelect*, 1(10), 2426–2438. [\[CrossRef\]](#)
126. Ghafary, S., Ghobadian, R., Mahdavi, M., Nadri, H., Moradi, A., Akbarzadeh, T., Najafi, Z., Sharifzadeh, M., Edraki, N., Moghadam, F. H., & Amini, M. (2020). Design, synthesis, and evaluation of novel cinnamic acid-tryptamine hybrid for inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Daru: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 28(2), 463–477. [\[CrossRef\]](#)
127. Peperidou, A., Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., Voulgari, E., & Avgoustakis, K. (2017). Multifunctional cinnamic acid derivatives. *Molecules*, 22(8), 1247. [\[CrossRef\]](#)
128. Offenbacher, A. R., Hu, S., Poss, E. M., Carr, C. A. M., Scouras, A. D., Prigozhin, D. M., Iavarone, A. T., Palla, A., Alber, T., Fraser, J. S., & Klinman, J. P. (2017).

- Hydrogen-deuterium exchange of lipoxygenase uncovers a relationship between distal, solvent exposed protein motions and the thermal activation barrier for catalytic proton coupled electron tunneling. *ACS Central Science*, 3(6), 570–579.[[CrossRef](#)]
129. Nachon, F., Carletti, E., Ronco, C., Trovaslet, M., Nicolet, Y., Jean, L., & Renard, P.-Y. (2013). Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: Elements of specificity for anti Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. *The Biochemical Journal*, BJ20130013 453(3), 393–399.[[CrossRef](#)]
  130. Schrodinger LLC. (2013). MacroModel, Version 10.
  131. Schrodinger LLC. (2013). MacroModel, Version 10.2.
  132. Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S., & Tirado-Rives, J. (1996). Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 118(45), 11225–11236.[[CrossRef](#)]
  133. Carter, G. W., Young, P. R., Albert, D. H., Bouska, J., Dyer, R., Bell, R. L., Summers, J. B., & Brooks, D. W. (1991). 5-Lipoxygenase inhibitory activity of zileuton. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 256(3), 929–937.
  134. Pohanka, M. (2014). Inhibitors of acetylcholinesterase and butyryl-cholinesterase meet immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(6), 9809–9825.[[CrossRef](#)]
  135. Pattar, S. V., Adhoni, S. A., Kamanavalli, C. M., & Kumbar, S. S. (2020). In silico molecular docking studies and MM/GBSA analysis of coumarin carbonodithioate hybrid derivatives divulge the anticancer potential against breast cancer. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 9(1), 36.[[CrossRef](#)]
  136. Booth, H. (1964). The average coupling constants of protons on adjacent carbon atoms in mobile cyclohexane systems. *Tetrahedron*, 20(10), 2211–2216.[[CrossRef](#)]
  137. Nickon, A., Castle, M. A., Harada, R., Berkoff, C. E., & Williams, R. O. (1963). Chemical shifts of axial and equatorial  $\alpha$ -protons in the N.M.R. of steroidal  $\alpha$ -haloketones. *Journal of the American Chemical Society*, 85(14), 2185–2186.[[CrossRef](#)]
  138. Nummert, V., Piirsalu, M., Mäemets, V., Vahur, S., & Koppel, I. A. (2009). Effect of ortho substituents on carbonyl carbon  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts in substituted phenyl benzoates. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 22(12), 1155–1165.[[CrossRef](#)]
  139. Imtiaz, S., Banoo, S., Muzaffar, S., & Ali, S. M. (2021). Structural determination of midazolam/beta-cyclodextrin inclusion complex by an already proposed protocol and molecular docking studies by quantitative analysis. *Structural Chemistry*, 32(4), 1505–1516.[[CrossRef](#)]
  140. Kuca, K., Musilek, K., Jun, D., Zdarova-Karasova, J., Nepovimova, E., Soukup, O., Hrabínova, M., Mikler, J., Franca, T. C. C., Da Cunha, E. F. F., De Castro, A. A., Valis, M., & Ramalho, T. C. (2018). A newly developed oxime K203 is the most effective reactivator of tabun inhibited acetylcholinesterase. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 19(1), 8.[[CrossRef](#)]

141. Newcomer, M. E., & Brash, A. R. (2015). The structural basis for specificity in lipoxygenase catalysis. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 24(3), 298–309.[CrossRef]
142. Bajda, M., WieRckowska, A., Hebda, M., Guzior, N., Sotriffer, C., & Malawska, B. (2013). Structure-based search for new inhibitors of cholinesterases. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 5608–5632.[CrossRef]
143. Guimarães, A. P., Oliveira, A. A., da Cunha, E. F. F., Ramalho, T. C., & Franca, T. C. C. (2011). Design of new chemotherapeutics against the deadly anthrax disease. Docking and molecular dynamics studies of inhibitors containing pyrrolidine and riboamidrazone rings on nucleoside hydrolase from *Bacillus anthracis*. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 28(4), 455–469.[CrossRef]
144. Chontzopoulou, E., Papaemmanouil, C. D., Chatziathanasiadou, M. V., Kolokouris, D., Kiriakidi, S., Konstantinidi, A., Gerogianni, I., Tselios, T., Kostakis, I. K., Chrysin, E. D., Hadjipavlou-Litina, D., Tzeli, D., Tzakos, A. G., & Mavromoustakos, T. (2021). Molecular investigation of artificial and natural sweeteners as potential anti-inflammatory agents. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1–13.[CrossRef]
145. Begum, S., Nizami, S. S., Mahmood, U., Masood, S., Iftikhar, S., & Saied, S. (2018). In-vitro evaluation and in-silico studies applied on newly synthesized amide derivatives of N-phthaloylglycine as butyrylcholinesterase (BChE) inhibitors. *Computational Biology and Chemistry*, 74, 212–217.[CrossRef]
146. Katsori, A. M., Chatzopoulou, M., Dimas, K., Kontogiorgis, C., Patsilinakos, A., Trangas, T., & Hadjipavlou-Litina, D. (2011). Curcumin analogues as possible anti-proliferative & anti-inflammatory agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(7), 2722–2735.[CrossRef]
147. Vrontaki, E., Leonis, G., Avramopoulos, A., Papadopoulos, M. G., Simcic, M., Grdadolnik, S. G., Afantitis, A., Melagraki, G., Hadjikakou, S. K., & Mavromoustakos, T. (2015). Stability and binding effects of silver(I) complexes at lipoxygenase-1. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30(4), 539–549.[CrossRef]