



Τεχνολογικό
Πανεπιστήμιο
Κύπρου

Σχολή
Γεωτεχνικών
Επιστημών και
Διαχείρισης
Περιβάλλοντος

Πτυχιακή εργασία

**UV/VIS ΚΑΙ FTIR ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ARTESUNATE ΜΕ ΤΟ
DNA**

Γεωργία Δημητρίου

Λεμεσός, Μάιος 2018

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Πτυχιακή εργασία

UV/VIS ΚΑΙ FTIR ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ARTESUNATE ΜΕ ΤΟ DNA

της

Γεωργίας Δημητρίου

Επιβλέπων Καθηγητής

Δρ. Κωνσταντίνος Κουτσοπάκης

Λεμεσός, Μάιος 2018

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Γεωργία Δημητρίου, 2018

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής εργασίας από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Κωνσταντίνο Κουτσουπάκη, για την καθοδήγηση και ουσιαστική υποστήριξη που μου πρόσφερε καθ' όλη τη διάρκεια διεκπεραίωσης της παρούσας πτυχιακής μελέτης αλλά και καθ' όλη τη φοιτητική μου σταδιοδρομία. Επιπρόσθετα, τον ευχαριστώ θερμά για το χρόνο που μου έχει αφιερώσει και την υπομονή που είχε σε οποιαδήποτε απορία και αν είχα.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Κωνσταντίνο Βαρώτση για τη παροχή των εργαστηρίων Περιβαλλοντικής Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, όπου εκπονήθηκε η πτυχιακή μου εργασία και παράλληλα για τις οποιοσδήποτε χρήσιμες συμβουλές του.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αγορά φαρμάκων εξακολουθεί να κυριαρχείται από μικρά μόρια με πάνω από το 80% της κλινικής εξέλιξης των υποψήφιων φαρμάκων στις 20 κορυφαίες φαρμακευτικές εταιρείες να εξακολουθεί να βασίζεται σε μικρά μόρια. Το υψηλό κόστος ανάπτυξης και παραγωγής “βιολογικών φαρμάκων” θα συμβάλλει στην παραγωγή φαρμάκων που βασίζονται σε μικρά μόρια με λιγότερο κόστος.

Στα πλαίσια μεταξύ βιολογικού και ορθολογικού σχεδιασμού, μπορεί κανείς να φανταστεί την παρασκευή υβριδικών μορίων με διπλό τρόπο δράσης για τη δημιουργία αποτελεσματικών νέων φαρμάκων. Τα υβριδικά μόρια ορίζονται ως χημικές οντότητες με δύο ή περισσότερες δομικές περιοχές με διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες και διπλή δραστηριότητα, υποδεικνύοντας τη δράση ενός υβριδικού μορίου ως δύο ξεχωριστά φαρμακοφόρα.

Το artesunate είναι ένα υδατοδιαλυτό, ημισυνθετικό παράγωγο της αρτεμισινίνης, μιας σεσκιτερπενικής λακτόνης, το οποίο παρουσιάζει ανθελονοσιακή, αντική και πιθανή αντινεοπλασματική δράση. Κατά την υδρόλυση του δραστικού τμήματος της γέφυρας ενδοπεροξειδίου του artesunate από την απελευθερωμένη αίμη (heme) των μολυσμένων από παράσιτα ερυθρών αιμοσφαιρίων, σχηματίζονται δραστικά ενδιάμεσα ριζών οξυγόνου (ROS) και άνθρακα, που έχουν αποδειχθεί ότι βλάπτουν και καταστρέφουν παρασιτικούς οργανισμούς. Επιπρόσθετα, πρόσφατες *in vitro* μελέτες αποδεικνύουν ότι ο παράγοντας αυτός είναι ικανός να προκαλεί θραύση του DNA με ένα δοσο-εξαρτώμενο τρόπο.

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι να διερευνήσει και να χαρακτηρίσει τον πρόσφατα προτεινόμενο τρόπο δράσης του artesunate ως αντικαρκινικό παράγοντα. Οι φασματοσκοπία υπεριώδης - ορατού (UV/Vis) και φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) αποτελούν δομικά και οξειδοαναγωγικά εργαλεία που είναι σε θέση να παρακολουθούν τις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ artesunate - DNA. Η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης(εων) του φαρμάκου - DNA αποτελεί ουσιαστικό μέρος του σχεδιασμού φαρμάκων και παρέχει επίσης τις απαραίτητες πληροφορίες για τον μηχανισμό δράσης του φαρμάκου σε μοριακό επίπεδο, καθώς οδηγούν στην αναγνώριση και εκλεκτικότητα του στόχου (DNA).

Στα φάσματα UV/Vis και FTIR που έχουν παρθεί παρουσιάζεται μια ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ artesunate - DNA. Οι ηλεκτροστατικές αυτές αλληλεπιδράσεις επαληθεύονται μέσω της παρατηρούμενης μετατόπισης των δονήσεων σε μεγαλύτερους ή μικρότερους κυματαριθμούς. Συγκεκριμένα, παρατηρείται μια μετατόπιση σε μεγαλύτερους κυματαριθμούς της δόνησης έκτασης του δεσμού C6=O6 της γουανίνης, μια μετατόπιση σε μικρότερους κυματαριθμούς της δόνησης έκτασης του δεσμού C4=O4 της θυμίνης και μια μετατόπιση της ασύμμετρης έκτασης της φωσφορικής ομάδας (PO₄²⁻). Οι υπέρυθρες μπάντες (bands) που σχετίζονται με την αδενίνη και την κυτοσίνη παρουσιάζουν αμελητέες αλλαγές και δεν υποδηλώνουν σημαντική αλληλεπίδραση-δέσμευση του artesunate σε αυτές τις θέσεις. Επιπρόσθετα, παρατηρείται σημαντική μετάβαση της B- προς την A- μορφή του DNA κατά τη δέσμευση (binding) του artesunate με το DNA, η οποία αποδεικνύεται από την εμφάνιση της χαρακτηριστικής δόνησης της A-μορφής στους 1189 cm⁻¹, η οποία αποδίδεται στη δόνηση επαναφοράς (backbone vibration) του σακχάρου και της φωσφορικής ομάδας. Τα συνδυασμένα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το artesunate δεσμεύεται κυρίως στην μεγάλη αύλακα της B- μορφής του DNA, με μικρό μέρος εξωτερικής αλληλεπίδρασης με την αρνητικά φορτισμένη φωσφορική ομάδα και το σάκχαρο. Σε μεγαλύτερες αναλογίες φαρμάκου:DNA, το artesunate είναι ικανό να παράγει σημαντική μετάπτωση του DNA από τη B- στην A- μορφή πιθανότατα λόγω αφυδάτωσης της μεγάλης αύλακας. Τα αποτελέσματα αυτά θέτουν τη βάση για περαιτέρω μελέτες σχετικά με το μηχανισμό δράσης του artesunate ως αντικαρκινικός παράγοντας.

Λέξεις κλειδιά: Artesunate, Φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού, υπέρυθρη φασματοσκοπία (FTIR, ATR), DNA

ABSTRACT

The drug market is still dominated by small molecules, and more than 80% of the clinical development of drug candidates in the top 20 pharmaceutical firms is still based on small molecules. The high cost of developing and manufacturing “biological drugs” will contribute to leaving an open space for drugs based on cheap small molecules.

At the border between bio-inspired design and rational design, one can imagine preparation of hybrid molecules with a dual mode of action to create efficient new drugs. Hybrid molecules are defined as chemical entities with two or more structural domains having different biological functions and dual activity, indicating that a hybrid molecule acts as two distinct pharmacophores.

Artesunate is a water-soluble, semi-synthetic derivative of the sesquiterpene lactone artemisinin with antimalarial, antishistosomiasis, antiviral, and potential antineoplastic activities. Upon hydrolysis of artesunate's active endoperoxide bridge moiety by liberated heme in parasite-infected red blood cells, reactive oxygen species and carbon-centered radicals form, which have been shown to damage and kill parasitic organisms. Additionally, recent *in vitro* studies demonstrate that this agent induces DNA breakage in a dose-dependent manner.

The objective of this study is to investigate and characterize the recently proposed mode of action of artesunate as anticancer agent. Ultraviolet/visible (UV/Vis) and Fourier transform Infrared (FTIR) spectroscopies are structure- and redox-sensitive tools able to monitor the non-bonding interactions between artesunate and DNA. Investigation of the drug-DNA interaction(s) is an essential part of drug designing, and also provides information about the drug's mechanism of action at molecular level, since they lead to target (DNA) recognition and selectivity.

The obtained UV/Vis and FTIR spectra are compatible with a series of definite non-bonding binding interactions between artesunate and DNA. These electrostatic interactions, are uncovered through the detected frequency upshift of the C6=O6 stretching mode of guanine, the frequency downshift of the C4=O4 stretching mode of thymine and the frequency downshift of the phosphate (PO₂⁻) antisymmetric stretching mode. Infrared bands related to adenine and cytosine exhibit negligible changes and suggest no major interaction-binding of artesunate at these sites. In addition, significant

transition from the B- to A-form of DNA is observed upon artesunate binding to DNA as evidenced by the appearance of the A-form marker band at 1189 cm^{-1} , which is attributed to a sugar-phosphate backbone vibration. The combined results indicate that artesunate acts mainly as a major groove binder to B-form DNA, with some amount of external interaction with the negatively charged phosphate and sugar backbone. At higher drug:DNA ratios artesunate is capable of producing major B- to A-form transition of DNA. These results put the basis for further studies about the mechanism of action of artesunate as anticancer agent.

Keywords: Artesunate, Ultraviolet-Visible spectroscopy (UV/Vis), Infrared spectroscopy (FTIR, ATR), DNA