



ISSN 2241-3081

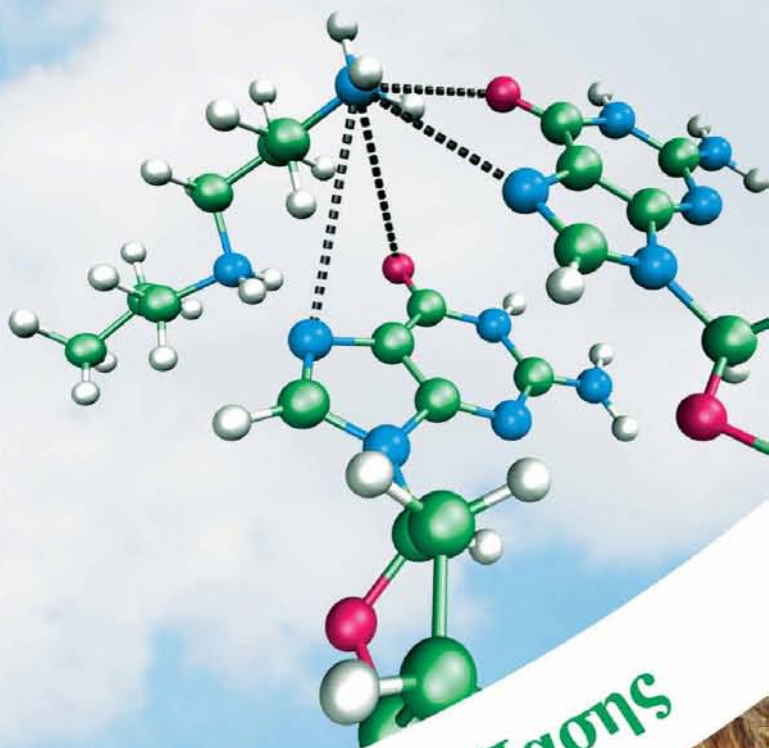
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΡΗΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΜΕ ΘΕΜΑΤΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
A QUARTERLY EDITION ON PHARMACEUTICAL SCIENCES' TOPICS

ΤΟΜΟΣ **25** | ΤΕΥΧΟΣ **IV**
VOLUME NUMBER
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ - ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ **2013**
OCTOBER - DECEMBER



Galenica



Αδιάκοπη Αναζήτηση της Ίασης



Galenica a.e.

ΑΘΗΝΑ: Ελευθερίας 4, 145 64 Κηφισιά • Τηλ.: 210 5281700, Fax: 210 5245939 • ΘΕΣΣ/ΚΗ: Κουντουριώτων & Φασιανού 2 • Τηλ.: 2310 542685 • <http://www.galenica.gr>

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

Τριμηνιαία έκδοση με θέματα
Φαρμακευτικών Επιστημών

Τόμος 25, Τεύχος IV, Οκτώβριος - Δεκέμβριος 2013

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ:

A. Τσαντίλη

*Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Αθηνών
tsantili@pharm.uoa.gr*

ΑΡΧΙΣΥΝΤΑΚΤΗΣ:

Γ. Α. Καρίκας

*Καθηγητής, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθηνών
karikasg@teiath.gr*

ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κ. Δεμετζος,

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Β. Δημόπουλος,

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

N. Κόλμαν, Galenica SA

Χ. Κοντογιώργης,

PhD, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Π. Κουρουνάκης,

Ομοτ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Π. Μαχαίρας,

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σ. Νικολαρόπουλος,

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Γ. Πάιρας,

Επίκ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Ε. Παντερή,

Αναπλ. Καθηγήτρια Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δ. Ρέκκας,

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

e-mail ΓΙΑ ΥΠΟΒΟΛΗ ΕΡΓΑΣΙΩΝ:

tsantili@pharm.uoa.gr

karikasg@teiath.gr

Για την ηλεκτρονική έκδοση της «Φαρμακευτικής»
και οδηγίες προς συγγραφείς επισκεφτείτε την διεύθυνση
www.hsmc.gr

Τα άρθρα που δημοσιεύονται
στην “Φαρμακευτική” καταχωρούνται
στα Chemical Abstracts, EMBASE και
Scopus.

PHARMAKEFTIKI

A quarterly edition
on Pharmaceutical Sciences' topics

Volume 25, Issue IV, October - December 2013

EDITOR:

A. Tsantili

*Professor, University of Athens
tsantili@pharm.uoa.gr*

CO EDITOR:

G.A. Karikas

*Professor, Technological Educational Institute of Athens
karikasg@teiath.gr*

EDITORIAL BOARD

C. Demetzos,

Professor, University of Athens

V.J. Demopoulos,

Professor, University of Thessaloniki

N. Kolman, Galenica SA

Ch. Kontogiorgis,

PhD, University of Thessaloniki

P. Kourounakis,

Emeritus Professor, University of Thessaloniki

P. Macheras,

Professor, University of Athens

S. Nikolaropoulos,

Associate Professor, University of Patras

G. Pairas,

Assistant Professor, University of Patras

I. Panderi,

Associate Professor, University of Athens

D. Rekkas,

Associate Professor, University of Athens

e-mail FOR MANUSCRIPT SUBMISSION:

tsantili@pharm.uoa.gr

karikasg@teiath.gr

For “Pharmakeftiki” electronic edition
and instructions to authors please visit
www.hsmc.gr

Articles published
in “Pharmakeftiki” are indexed
in Chemical Abstracts, EMBASE and Scopus.

ΑΡΘΡΟ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗΣ

Μηχανικά Νανοϋλικά για Καινοτόμες
Βιοϊατρικές Εφαρμογές, Φαρμακευτικές
Ουσίες, Προϊόντα Προσωπικής Φροντίδας
και Προστασίας Δέρματος.
Τοξικολογικά Προβλήματα και Εκτίμηση
Κινδύνου για τον Άνθρωπο

Θωμαΐς Βλαχογιάννη,
Σταμάτιος Περγιδάκης,
Αθανάσιος Βαλαβανίδης 109-122

ΑΡΘΡΟ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗΣ

Ορθολογική Προσέγγιση για την Ανακάλυψη
Ενώσεων-Οδηγών με τη Χρήση
Φαρμακοφόρων Μοντέλων.
Χρήση της Τράπεζας Ενώσεων Zinc
στην Εικονική Σάρωση (Virtual Screening)

Ελένη Κουλουρίδη,
Thierry Langer,
Sharon D. Bryant,
Θωμάς Μανρομούστακος 123-134

ΑΡΘΡΟ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗΣ

Φαρμακευτικά φυτά στην επούλωση
τραυμάτων

Βουδούρη Δήμητρα,
Τεσσαροματιά Χριστίνα 135-144

Εκδηλώσεις 145

Νέα Εξελίξεις 146

REVIEW ARTICLE

Engineered Nanomaterials
for Biomedical Applications,
Pharmaceuticals, Personal
Care Products and Skin Protection.
Toxicological Problems and Risk Assessment
to Humans

Thomais Vlachogianni,
Stamatios Perdicaris,
Athanasios Valavanidis 109-122

REVIEW ARTICLE

Rational Approach for the discovery
of Lead-compounds using
Pharmacophore Models.
The Use of Drug Databank Zinc
in Virtual Screening.

Eleni Koulouridi,
Thierry Langer,
Sharon D. Bryant,
Thomas Mavromoustakos..... 123-134

REVIEW ARTICLE

Medicinal Plants
in Wound Healing

Dimitra Voudouri,
Christina Tesseromati 143-152

Meetings 145

News & Developments 146

Γραφείο Διοίκησης Ελληνικής Εταιρείας Φαρμακοχημείας
ΖΙΤΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑΚΕΣ
ΚΑΙ ΤΟΥΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΙΣ ΑΕ
1ο χλμ Παιανίας - Μαρκοπούλου
19002, Παιανία, Ελλάδα
Τηλ: +30 211 100 1770-71
E-mail: info@zita-congress.gr

Hellenic Society of Medicinal Chemistry Management Office
ΖΙΤΑ CONGRESS SA
1st klm Peanias-Markopoulou
19002, Peania, Greece
Tel: +30 211 100 1770-71
Email: info@zita-congress.gr

Engineered Nanomaterials for Biomedical Applications, Pharmaceuticals, Personal Care Products and Skin Protection. Toxicological Problems and Risk Assessment to Humans

Thomais Vlachogianni¹, Stamatios Perdicaris², Athanasios Valavanidis¹

¹Department of Chemistry, University of Athens, University Campus Zografou, 15784, Athens, Greece

²Faculty of Pharmacy, University of Athens, University Campus Zografou, 15784, Athens, Greece

Summary

Nanotechnology and applications in consumer and advanced technological products emerged as one of the central new technologies in the 21st century. Thousand of scientists and technologists are employed in this area and a great number of technological advanced nanoproducts have flooded the market of the developed world. Future prospects in different fields of nano-applications seem unlimited and its high potential will affect our daily life, our health and the environment in the years to come. Engineered NanoMaterials (ENMs) found applications in the fields of consumer products, such as cosmetics, textiles, diagnostic materials, personal care products, paints, food, energy, medicines, computers, portable telephones etc. After years of intensive amount of research ENMs advanced into various applications because of their unique optical, electronic, magnetic, mechanical and chemical properties. These advantageous properties can be attributed to their special minute size, shape and special chemical characteristics. In this review we focused in the most important fields for ENMs applications in biomedicine, pharmaceuticals, personal care products, skin protection and diagnostic medical materials. In addition, in this review we examine at length the most important toxicological and safety aspects of ENMs during the manufacturing processes and for the consumers. The review deals with the whole spectrum of human health and safety problems from the extensive use of ENMs and their potential for cytotoxicity and biological damage.

1. Introduction: The technological revolution of nanotechnology.

Nanotechnology is the technological revolution of the last decades that deals with the manipulation of matter on an atomic and molecular scale. Scientists and engineers had precisely manipulate chemical atoms and molecules for fabrication of macroscale products with a wide range of applications. These are called engineered nanomaterials (ENMs).^{1,2}

Nanotechnology includes fields of science as diverse as surface science, organic chemistry, molecular biology, semiconductor physics, microfabrication, etc. Applications of ENMs are equally diverse, ranging from extensions of conventional device physics to completely new approaches based upon molecular self-assembly, from developing new materials at nanoscale range. Biomedical imaging, drug delivery, bio-molecular sensing, tissue engineering, data storage, photocatalytic pigments, food packaging, cosmetics, textiles, etc, are some of the major fields with “revolutionary” nanotechnological applications.^{3,4}

Nanotechnology became very soon an important industrial sector in industrialized countries. The industrial sector in the USA and the government established the National Nanotechnology Initiative (NNI, 2000) to serve as the central point of communication, cooperation, and collaboration for all Federal agencies engaged in nanotechnology research, bringing together the expertise needed to advance this broad and complex field. The NNI defined nanotechnology as the manipulation of

matter with at least one dimension sized from 1 to 100 nanometers (nm), reflecting the fact that quantum mechanical effects are important at this quantum-realm scale.⁵

Because of the variety of potential industrial and military applications, governments in developed countries have invested billions (dollars or euros) in nanotechnology research. The USA through NNI has invested 3.7 \$ billion, the European Union countries 1.2 \$ billion and Japan 750 \$ million (in the period 2004-2005). In 2009, President Dmitry Medvedev announced that Russia will channel 318 billion rubles (\$10.6 billion) into development of nanotechnology by 2015.⁶

The Organization Cientifica Ltd (July 2011) estimated in its Annual Global Nanotechnology Research Funding report, that the world's governments currently spend \$10 billion per year, with that figure set to grow by 20% over the next three years. In 2011 it is estimated that China will spend US\$2.25 billion in nanotechnology research. Worldwide statistics showed that the total government funding for nanotechnology research will be \$65 billion, rising to \$100 billion by 2014.⁷

According to a recent conference report, in the period 2009-2010 the corporations and institutional investors for nanotechnology R & D reached 9,2 and 9,7 \$ billions respectively, and governments spent 8,4 and 8,2 \$ billions. The sectors that are leading the nanotechnology R&D are transportation and aerospace, nanomedicine, electronics, energy, food and food packaging.⁸

In the last decade, nanotechnology applications and ENMs continue to evolve rapidly and the overall market for new nanoproducts is growing, along with the degree to which they are permeating our everyday lives. The Woodrow Wilson International Center for Scholars (WWICS) in the USA established a Project on Emerging Nanotechnologies (April 2005) as a partnership between the WWICS and the Pew Charitable Trusts. The Project was dedicated to helping ensure that as nanotechnologies advance, possible risks are minimized, public and consumer engagement remains strong, and the potential benefits of these new technologies are realized. The Project identified a list of more than 1,600 nano-enabled products currently on the market, reflecting a 50% increase, since this list was first compiled in 2006. The list contains information on products from over 20 countries.^{9,10}

Nanomaterials can take a variety of forms, but for simplicity can generally be organized into four types:

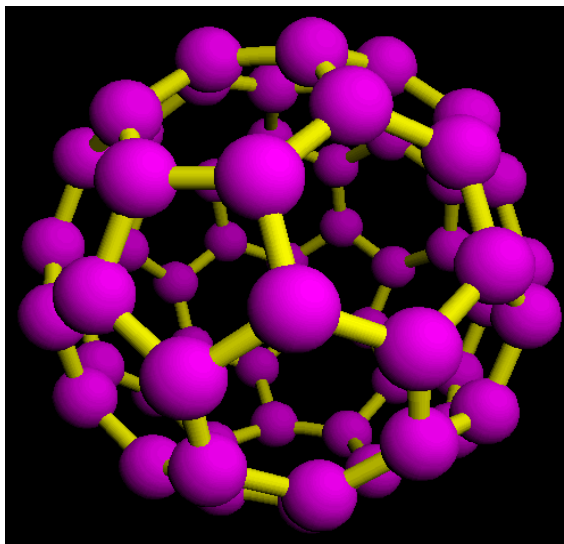
a) *Carbon-based materials*. Composed mostly of carbon (spherical, elliptical, or tubular in shape).

Spherical and elliptical carbon shapes are referred to as fullerenes, while tubular ones are called nanotubes.,

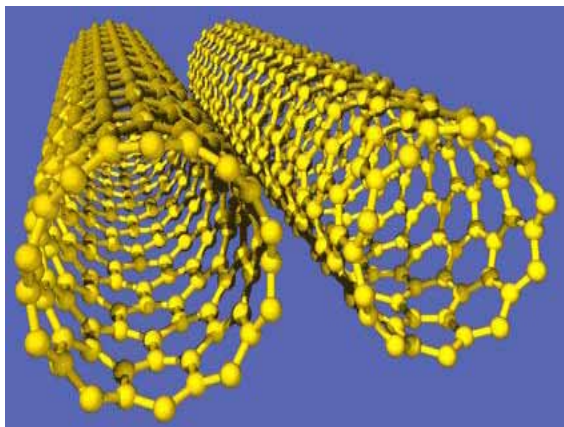
b) *Metal-based materials*: include nanoscale gold (Au), nanoscale silver (Ag), and metal oxides, such as titanium dioxide (TiO₂). They also include quantum dots, which are closely packed semiconductor crystals comprised of hundreds or thousands of atoms, on the scale of a few nanometers

c) *Dendrimers*: nanoscale polymers built from branched units. The surface of a dendrimer has numerous branch ends, tailored to perform specific chemical functions with interior cavities into which other molecules can be placed, such as for drug delivery.

d) *Composites*: Combine nanoparticles with other nanoparticles or with larger, conventional-scale materials (e.g. nanoscale clay can be combined with other materials to form a composite material).



Buckminster fullerene C₆₀



Carbon nanotube structures.

Figure 1. Shapes, structures and types of nanomaterials

Cosmetics, textiles, food contact materials, biosensors, drug delivery, UV blockers in sunscreen crèmes, fuel additives, medical imaging techniques, photovoltaics are technological fields where ENMs found applications. Application of nanotechnology in medical and pharmaceutical fields is fuelling hopes to significantly improve diagnosis and drug treatment of all kinds of diseases. In addition, nanomaterials are expected to be instrumental in waste remediation and in the production of efficient energy storage devices and thus may help to overcome world's energy problems. Finally, novel nanotechnologies and technological advances, after many years of research efforts are leading the revolution of computer, portable telephones and data storage technologies. In the near future it is hoped that ENMs will apply to a great variety of domestic consumer products^{11, 12}

2. Nanomaterials: Types, examples, properties and uses

The great variety of types of Engineered NanoMaterials (ENMs) are presented in a comprehensive form in Table 1.

Engineered NanoMaterials (ENMs), are designed with very specific properties through certain chemical and physical processes, such as self-assembly (from atoms and molecules) or milling (from their macro-scale counterparts), and may be released into the environment primarily through industrial and environmental applications or improper handling. Due to their novel nanoscale size, ENMs may possess unique chemical, biological, and physical properties as compared to larger particles of the same material. The unique properties of ENMs allow them to be used for various applications. In 2011 there were more than 1,000 consumer products that contain ENMs on the market.¹³

Nanotechnology has revolutionized many areas of modern life, yet the public has little understanding of the technology or its ethical implications. Indeed, the ethical, social, and political dimensions of nanotechnology are only beginning to receive the attention they require. Surveillance devices may become so small that they are practically invisible to the naked eye, raising concerns about privacy. Nanomedicine may lead to the development of new diagnostic and therapeutic devices, yet anxieties have been raised about the impact of "nanobots" circulating in our bodies. Military applications, or misuses, of nanotechnology raise other concerns. There are already books that explore in an accessible and informative way how nanotechnology is likely to impact the lives of ordinary people in the coming years and why ethical reflection on nanotechnology is needed.¹⁴

3. Nanomaterials for biology, medicine and pharmaceutical applications

Nanomaterials have advantageous properties which can be attributed solely to their special size and shape. Furthermore, most ENMs can be very easily functionalized on the surface with synthetic ligands to effect significant change in their properties. In this respect ENMs are proved to be very versatile and can be transformed into various applications. A significant range of applications of ENMs are for biology, medicine and pharmaceuticals.

Biomedical and other Applications involving ENMs include:

3.1. Bio-molecular Sensing (nanoscaled electrochemical detection, functional nanomaterial-amplified optical assays, colorimetry, fluorescence and electrochemiluminescence, as well as biomedical diagnosis applications, (e.g. for cancer and bone disease).¹⁵

The oscillation of electrons on the surface of metallic nanomaterials can amplify the absorption and scattering of light, a phenomenon known as surface plasmon resonance (SPR). Absorbed light can be emitted as fluorescence (light of a different wavelength). Applications such as sensors and solar cells can take advantage of this property of silver nanomaterials with application in biomedical imaging. Surface plasmon resonance is one of the most commonly exploited label free optical bio-sensing techniques in use today.^{16,17}

3.2. Biological Imaging (optoelectronic properties of metal nanoparticles). Magnetic nanoparticles (iron oxide) can be used in Magnetic Resonance Imaging (MRI) because can be easily guided through the human body with the help of external magnetic field. Different polymers/molecules can be used for nanoparticle coating to stabilize the suspensions of magnetic nanoparticles under *in vitro* and *in vivo* situations. Some selected proteins/targeting ligands that could be used for derivatizing magnetic nanoparticles have found applications. Various biomedical applications have already use magnetic nanoparticles for early detection of cancer, diabetes and atherosclerosis.¹⁸

3.3. Drug Delivery Vehicles (as micelles and vesicles), Carbon nanotubes are organic and therefore compatible with living organism tissues and can be used in a variety of applications as carriers of drugs in appropriate position inside the human body.

Many different types of drug delivery systems are currently available. Carbon nanotubes (CNT) have emerged as a new alternative and efficient tool for transporting and translocating therapeutic

Table 1. Types, Examples, Physical and Chemical properties and Uses of ENMs. [Environ.Prot. Agency. EmergingContaminants--NanoMaterials.Fact Sheet., May2012 http://www.epa.gov/fedfac/pdf/emerging_contaminants_nanomaterials.pdf]

Type of ENMs	Examples	Physical & Chemical Properties	Uses in various fields
Carbon-based (Natural or Engineered)	Fullerenes/Buckyballs (Carbon 60, Carbon 20, Carbon 70); carbon nanotubes; nanodiamonds; nanowires.	Hollow spheres (buckyballs), ellipsoids, tubes (nanotubes); 1nm wires (nanowires) or hexagonal structures (nanodiamonds). Excellent thermal and electrical conductivity. Carbon-based ENMs are stable, have limited reactivity, strong antioxidants.	Biomedical applications, supercapacitors, sensors, & photovoltaics.
Metal Oxides (Natural or Engineered)	Titanium dioxide (TiO ₂); zinc oxide (ZnO); cerium oxide (CeO ₂).	Photocatalytic properties, & ultraviolet (UV) blocking ability Used in sunscreen, nano-TiO ₂ and nanoZnO transparent when applied on skin High reactivity; photolytic properties.	Photocatalysts, pigments, drug release, Medical diagnostics, UV blockers in sunscreen, diesel fuel additive, and remediation.
Zero-Valent Metals	Nanoscale zero-valent iron (nZVI), emulsified zero-valent nanoscale iron, & bimetallic nanoscale particles (BNPs). BNPs include elemental iron and a metal catalyst (such as gold, nickel, palladium, or platinum)	Between 1 to 100 nm depending on the ENM-type containing the zerovalent metal. Properties controlled by varying the reductant type & reduction conditions. High surface reactivity. Popular starting materials used in production include: ferric (Fe [III]) or ferrous (Fe [II]) salts with sodium borohydride.	Remediation of waters, sediments, & soils to reduce contaminants such as nitrates, trichloroethene, and tetrachloroethene.
Quantum Dots (Engineered)	Quantum dots made from cadmium selenide (CdSe), cadmium telluride (CdTe), and zinc selenide (ZnSe). Size: 10 to 50 nm.	Reactive core controls the material's optical properties. The larger the dot, the redder (lower energy) its fluorescence spectrum. Closely packed semiconductor whose excitons. Possible metal structures include: CdSe, CdTe, CdSeTe, ZnSe, InAs, or PbSe, for the core; CdS or ZnS for the shell.	Medical imaging, photovoltaics, Applications in Telecommuni-cation, & as optoelectronic sensors.
Dendrimers (Engineered)	Dendrimers Hyperbranched polymers, dendrigraft polymers, and dendrons. Size: 2 to 20 nm.	Highly branched polymers. Common shapes include cones, spheres, and disc-like structures. Highly branched; multifunctional polymers.	Drug delivery, chemical sensors, modified electrodes, & DNA transferring agents.
Composite ENMs (Engineered)	Made with two different ENMs or ENMs combined with larger, bulk-type materials. They can also be made with ENMs combined with synthetic polymers or resins	Composite NMs have novel electrical, magnetic, mechanical, thermal, or imaging features. Multifunctional components; catalytic features	Potential applications in drug delivery & cancer detection. Auto parts and packaging materials to enhance mechanical & flame-retardant properties
Nanosilver (Engineered)	Forms include colloidal silver, spun silver, nanosilver powder, and polymeric silver.	Size: 10 to 200 nm. Made up of many atoms of silver in the form of silver ions (Ag). High surface reactivity; strong antimicrobial properties.	Medicinal applications, Water purification & antimicrobial uses. Used for a wide variety of commercial products

molecules. CNT can be functionalised with bioactive peptides, proteins, nucleic acids and drugs, and used to deliver their cargos to cells and organs. Because functionalised CNT display low toxicity and are not immunogenic, such systems hold great potential in the field of nano-biotechnology and nanomedicine.¹⁹

Drug delivery with carbon nanotubes for treatment of cancer has been advanced by many research groups. An example, chemically functionalized single-walled carbon nanotubes (SWNT) have shown promise in tumour-targeted accumulation in mice and exhibit biocompatibility, excretion, and little toxicity. Conjugate paclitaxel, a widely used cancer chemotherapy drug, to branched polyethylene glycol chains on SWNTs via a cleavable ester bond to obtain a water-soluble SWNT-PTX conjugate. SWNT-PTX affords higher efficacy in suppressing tumor growth than clinical Taxol in a murine 4T1 breast cancer model, owing to prolonged blood circulation and 10-fold higher tumour paclitaxel uptake by SWNT delivery likely through enhanced permeability and retention. Thus, nanotube drug delivery has been a promising for high treatment efficacy and minimum side effects for future cancer therapy with low drug doses.²⁰

Scientists focused on new nano-scale drug carriers (using dendrimers) that offer the possibility of increasing the therapeutic index of drug molecules by increasing their effectiveness, lowering their toxicity and achieving controlled therapeutic levels for a prolonged time. A recent overview presented approaches to the development of these novel complex nanocarriers with emphasis on those involving dendrimers and related systems.²¹

3.4.Disease Therapy (e.g. “nanoantibiotics” for infectious diseases). Several classes of antimicrobial nanoparticles (NPs) and nanosized carriers for antibiotics delivery have proven their effectiveness for treating infectious diseases, including antibiotics resistant ones, *in vitro* as well as in animal models.²²

A recent review described the development of new non-invasive strategies for the diagnosis and treatment of cancer with nanomaterials. Significant synthetic advances now allow for the preparation of ENMs with highly controlled geometry, surface charge, physicochemical properties, and the decoration of their surfaces with polymers and bioactive molecules in order to improve biocompatibility and to achieve active targeting. These new developments are stimulating the development of a diverse range of nanometer-sized objects that can recognize cancer tissue, enabling visualization of tumours, delivery of anti-cancer drugs and/or the destruction of tumours by different therapeutic techniques.²³

3.5. Scaffolds in Tissue Engineering applications.

A recent review described the tissue-engineering scaffolds in nanotechnology. The scaffold must be analogous to native extracellular matrix of tissue in both chemical composition and physical structure. Polymeric nanofiber matrix is quite similar, with its nanoscaled nonwoven fibrous matrix proteins, and thus is a candidate of extracellular matrix-mimetic material. Electrospinning to produce polymeric nanofibers have stimulated researchers to explore the application of nanofiber matrix as a tissue-engineering scaffold.²⁴

Carbon nanotubes (CNT) are also attractive for use in fiber-reinforced composite materials due to their very high aspect ratio, combined with outstanding mechanical and electrical properties. Composite materials comprising a collagen matrix with embedded CNT were prepared by mixing solubilized Type I collagen with solutions of carboxylated single-walled carbon nanotubes (SWNT). Living smooth muscle cells were incorporated at the time of collagen gelation to produce cell-seeded collagen–CNT composite matrices. Such collagen–CNT composite matrices have utility as scaffolds in tissue engineering, or as components of biosensors or other medical devices.²⁵

3.6. Immunoassays Applications with Quantum Dots (e.g. proteins and other analysis) A recent review examined the progress in adapting quantum dots QDs for several predominantly *in vitro* biosensing applications including use in immunoassays. Luminescent semiconductor nanocrystals or QDs are a recently developed class of nanomaterial whose unique photophysical properties are helping to create a new generation of robust fluorescent biosensors. QD properties of interest for biosensing include high quantum yields, broad absorption spectra coupled to narrow size tunable photoluminescent emissions and exceptional resistance to both photobleaching and chemical degradation.²⁶

Various publications in the last years cover the many aspects of nanomaterial application in fields of life sciences, biosensors, biomedical and pharmaceutical products.²⁷⁻³¹

4. Nanomaterials in personal care products, skin protection and cosmetics

In the last years ENMs found multiple uses in formulations of personal care products (e.g. toothpaste, cleaning agents, hygiene care, mouthwash, shampoo, talcum powder, shaving cream, etc), cosmetics (perfume sprays, lipstick, hair dyes, etc), and skin protection (wound infection, burnings, sunscreen creams, etc)

Silver nanoparticles (SNPs) can be used an

antimicrobial agent and prevent skin and other infections. SNPs remained popular agents for wound infections, especially in burned patients. In the last decade incorporation silver into a range of hygiene and healthcare products has been widespread, although raised concerns over toxicity. The published evidence for resistance and toxicity is limited and associated with frequent and high levels of silver used. Research on SNPs showed evidence of improved antimicrobial activity and possible dual immunomodulatory effects. This may lead to further product development as potential alternative preservatives as some currently available preservatives have an increasing incidence of allergic reactions.³²

In recent years nanoemulsions have attracted considerable attention for application in personal care products as potential vehicles for the controlled delivery of cosmetics and the optimized dispersion of active ingredients in particular in topical application on skin.³³

In the last decade many Personal Care Products (PCP) include micron- or nano-sized formulation components, such as nanoemulsions or microscopic vesicles. The addition of Engineered NanoParticles (ENPs) enhance the properties of the PCP and makes its use more beneficial. At the same time a large number of studies suggest that such vesicles do not penetrate human skin beyond the superficial layers of the stratum corneum. For example, modern sunscreens contain insoluble titanium dioxide (TiO₂) or zinc oxide (ZnO) nanoparticles which are efficient filters of UV light. A large number of studies suggest that insoluble NP do not penetrate into or through human skin. Cytotoxicity, genotoxicity, photo-genotoxicity, general toxicity and carcinogenicity studies on TiO₂ and ZnO NP found no difference in the safety profile of micro- or nano-sized materials, all of which were found to be non-toxic. Although some published in vitro studies on insoluble nano- or micron-sized particles suggested cell uptake, oxidative cell damage or genotoxicity, these data are consistent with those from micron-sized particles and should be interpreted with caution. Overall, the weight of scientific evidence suggests that insoluble ENPs used in sunscreens pose negligible risk to human health, but offer large health benefits, such as the protection of human skin against UV-induced skin ageing and cancer.³⁴

Many new nanotechnology personal products combine cleansing and healing. A large number are used in the area of PCP, cosmetics, skin protection and anti-aging agents. Nanotechnology has played an important role in delivering active ingredients to the skin, in both patch delivery and timed release application. The latest trend in these products is

to combine clinically proven ingredients with patented delivery systems and the aesthetics of fine cosmetics. *Cosmeceutical* products are those poised on the gap between cosmetic products that simply cleanse and beautify and pharmaceuticals that cure and heal. Cosmetic industries rank high among the nanotechnology patent holders in U.S and in Europe.³⁵

In the last decade new classes of nanomaterials in PCPs have been developed that release the active ingredient in the right time direct the deposition to occur in the right site. The development of such systems is based on polymer/surfactant colloid chemistry which achieve transport and release of cosmetic and pharmaceutical molecules at desired rates and at desired sites. New hybrid polymers and nanogels have been synthesized for tuning up nanodomains that can extract and deliver at will cosmetics/drugs/toxins by perturbing pH, temperature or ionic strength of the system. Nanogels developed recently include that of polyacrylamide, poly(acrylic acid) and starch nanogels modified for extraction and subsequent slow release of fragrances and overdosed toxic drugs.³⁶

5. Engineered Nanomaterials in consumer products and concerns of toxicity

The sudden rise of a vast range of applications of nanomaterials in the last decade prompted scientists to debate the future implications of nanotechnology in environmental pollution. As any new technology the main concerns were about environmental pollution, the toxicity in aquatic organisms and their environmental impact in ecosystems. These concerns have and ethical issues led to a debate among advocacy groups, governments and in the European Union (EU) on whether special regulation of nanotechnology is warranted.^{37, 38}

In the USA, the Food and Drug Administration (FDA) regulates nanotechnology differently. It established a draft guidance for industry in June 2011 for both "Cosmetic Products" and "Food Ingredients and Food Contact Substances" in April 2012. These documents do not restrictedly define the physical properties of nanomaterials, but when manufacturing changes alter the dimensions, properties, or effects of an FDA-regulated product, the products are treated as new commercial products [<http://www.fda.gov/Cosmetics/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ucm300886.htm>].³⁹

Nanomaterials are used in a variety of FDA-regulated products because of their unique properties, imparting potential advantages to products. In the USA the law does not subject cosmetic products and

ingredients to pre-market approval by FDA. Rather, firms and individuals who market cosmetics have a legal responsibility to make sure their products and ingredients, including nanoscale materials, are safe under labelled or customary conditions of use, and that they are properly labelled. FDA monitors the use of nanoscale materials in cosmetics and keeps abreast of research into their safety.⁴⁰

Also, safety of nanotechnology products is the concern of environmental organizations. In 2006, the organization Friends of the Earth released a report, “*Nanomaterials, Sunscreens and Cosmetics: Small Ingredients, Big Risks.*” [[http://libcloud.s3.amazonaws.com/93/ce/0/633/](http://libcloud.s3.amazonaws.com/93/ce/0/633/Nanomaterials_sunscreens_and_cosmetics.pdf)

[Nanomaterials_sunscreens_and_cosmetics.pdf](http://libcloud.s3.amazonaws.com/93/ce/0/633/Nanomaterials_sunscreens_and_cosmetics.pdf)]. Since then, they have released updated reports every year, sharing more and more about these alarming risks, which could affect consumers, workers, and the environment. FoE gathered many scientific evidence showing that nanomaterials have the potential for adverse effects. Recently the FoE report on nanosunscreens “*Manufactured Nanomaterials and Sunscreens: Top Reasons for Precaution.*” (August 2009) [http://libcloud.s3.amazonaws.com/93/14/0/632/Manufactured_nanomaterials_and_sunscreens_reasons_for_precaution.pdf] The organizational FoE efforts are focused on ensuring that at the end of the day (someday) consumers will be granted the rights and products they deserve. These changes will allow consumers to make healthier and more informed choices.⁴¹

Such international movements indicate that most of nanomaterials with any new properties would be assessed or regulated as new products by most of national authorities in near future, although the approaches are still case by case.

6. Health and safety problems for workers in the manufacturing processes of nanomaterials

Engineered nanomaterials, as with any new technology and the related manufacturing processes, the earliest and most extensive exposure to hazards is most likely to occur in the working environment. Workers working in nanotechnology-related industries and small workshops have the potential to be exposed to uniquely engineered materials with novel sizes, shapes, and physical and chemical properties. Our understanding of the occupational, health and safety aspects of ENMs is still in its formative stage.

The scientific information that is currently available on exposure routes, potential exposure levels, and material toxicity of nanomaterials is very limited. The first studies focused on the low solubility of

nanoparticles because of their higher toxicity potential. Nanoparticles during manufacturing processes can penetrate into the respiratory system and through the blood circulation can move into other organs. Studies showed strong indications that nanoparticles can penetrate through the skin. Survey of the scientific literature indicates that the available information is incomplete many of the early findings have not been independently verified. Current recommendations for ENMs in the working environment, in order to minimize exposure and hazards to workers are largely based on common sense, knowledge by analogy to ultrafine material toxicity, and general health and safety recommendations. There are strong indications that nanoparticle surface area and surface chemistry are responsible for observed responses in cell cultures and animals.^{42,43}

Studies showed that most airborne Carbon NanoTubes (CNTs) or Carbon NanoFibers (CNFs) found in workplaces (during the manufacturing processes) are loose agglomerates of micrometer diameter. However, due to their low density, they linger in workplace air for a considerable time, and a large fraction of these structures are respirable. So, industrial workers are the first to be exposed to nanomaterials at high concentrations.⁴⁴

The first scientific studies in rat and mouse models, pulmonary exposure to single-walled carbon nanotubes (SWCNTs), multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs), or CNFs causes the following pulmonary reactions: acute pulmonary inflammation and injury, rapid and persistent formation of granulomatous lesions and progressive alveolar interstitial fibrosis at deposition sites. Pulmonary exposure to nanoparticles can induce oxidative stress in aortic tissue and increases plaque formation in an atherosclerotic mouse model. Pulmonary exposure to MWCNTs depresses the ability of coronary arterioles to respond to dilators. These cardiovascular effects may result from neurogenic signals from sensory irritant receptors in the lung. In addition, pulmonary exposure to MWCNTs may induce levels of inflammatory mediators in the blood, which may affect the cardiovascular system. Intraperitoneal instillation of MWCNTs in mice has been associated with abdominal mesothelioma (this was a typical disease of asbestos fibers exposure of workers in the past decades). However, further studies are required to determine whether pulmonary exposure to MWCNTs can induce pleural lesions or mesothelioma.⁴⁵

The adverse health effects in workers of nanotechnology industries became recently a concern. to NIOSH (National Institute of Occupational Safety and Health, USA, which is the leading federal agency

conducting research and providing guidance on the occupational safety and health implications and applications of nanotechnology. Additionally, NIOSH recommended that engineering controls and personal protective equipment can significantly decrease workplace exposure to CNTs and CNFs. Considering the available data on health risks, it appears prudent to develop prevention strategies to minimize workplace exposure, such as enclosure, exhaust ventilation and respiratory protective masks or respirators) and worker training for good handling practices.⁴⁶

NIOSH has also created a field research team to assess workplace processes, materials, and control technologies associated with nanotechnology. But, much research is still needed to understand the impact of nanotechnology on health, and to determine appropriate exposure monitoring and control strategies. At this time, the limited evidence available suggests caution when potential exposures to nanoparticles may occur.⁴⁷

The Health and Safety Executive (HSE) which deals with the UK regulatory framework for occupational health and safety in the workplaces is covering the safe use and handling of manufactured nanomaterials. The Report “Using Nanomaterials at Work” is a new guidance prepared in response to emerging evidence about the toxicity of these materials. It is specifically about the manufacture and manipulation of all nanomaterials including carbon nanotubes (CNTs) and high aspect ratio nanomaterials (HARNs). It has been prepared in response to emerging evidence about the toxicity of these materials.⁴⁸

The Federal Institute for Occupational Safety and Health (BAuA, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin) in Germany together with the German Chemical Industry Association (Verband der Chemischen Industrie/VCI), the Federation of German Industry (BDI) and the Federal Ministry of Education and Research (BMBF) started a second survey (2011) on occupational health and safety in the handling and use of nanomaterials. The awareness to the topic and the scientific and pragmatic approach led to high number of answers from industry, research organisations, universities and state institutions.⁴⁹

A working group consisting of the Institute of Energy and Environmental Technology e.V. (IUTA), the Federal Institute for Occupational Safety and Health (BAuA), the German Social Accident Insurance Institution for the Raw Materials and Chemical Industry (BG RCI), the Institute for Occupational Safety and Health of the DGUV (IFA), the Technical University Dresden (TUD) and the German Chemical Industry Association (VCI) published the document “Tiered Approach to an

Exposure Measurement and Assessment of Nanoscale Aerosols Released from Engineered Nanomaterials in Workplace Operations” (in 2011).⁵⁰

Also, the competent authorities for protection of workers and the environment in Germany with the Federal Environment Ministry developed the idea for amending the REACH regulation of the EU because there is need for better identification and assessment for potential hazards arising from nanomaterials in the future.⁵¹

7. Nanomaterials: Are they health risks to consumers from exposure to nanoproducts?

Concerns over consumer health and safety from ENMs was inevitable to develop by various toxicological scientist and agencies for the protection of consumers and the environment.

There is an important Report by RIVM (National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven The Netherlands): titled: “*Exposure to Nanomaterials in Consumer Products*” (Letter Report 340370001/2009, www.rivm.nl) which have an extensive catalogue of nanomaterials in various types of consumer products. The nanomaterials are mainly in the form of particles, composites, capsules, fullerenes, carbon nanotubes, coatings, nanoporous materials, quantum dots, nanofibres and nanowires. The report describes the toxicological problems of the various consumer products as far as health and safety is concerned. According to the report the most alarming use is for foodstuffs.⁵²

The first problem to consumers is *inhalation exposure* from the use of products with engineered materials with smaller than 100 nm diameter can potentially become airborne particles. These “nanostructured particles” are potentially of concern if they can deposit in the respiratory system of the consumer toxicity (nanoparticles have high surface area and surface activity). Classes of nanoparticles can cause respiratory toxicity to consumers especially for discrete nanometer-diameter particles, agglomerates of nanoparticles, and droplets of nanomaterial solutions, suspensions, or slurries.⁵³

Another form of exposure to ENMs is *dermal penetration* that give concern to toxicologists for the variety of consumer products. Skin can be exposed to solid nanoscale particles in cosmetics through either intentional or non-intentional means. Intentional dermal exposure to nanoscale materials may include the application of lotions or creams containing nanoscale TiO₂ or ZnO as a sunscreen component or fibrous materials coated with nanoscale substances for water or stain repellent properties. Non-

intentional exposure could involve dermal contact with anthropomorphic substances generated during nanomaterial manufacture or combustion.⁵⁴

Despite the recent advances It is unclear whether nanoparticles can penetrate the human skin and have any toxicological impact. Concerns regarding dermal penetration include skin or other organ cytotoxicity, accumulation, metabolism and photoactivation on skin. An example of dermal contact with nanoparticles, is the nanoscale TiO_2 and ZnO (<100 nm) which are included in sunscreens because of their ability to block ultraviolet (UV) light. It is known that TiO_2 particles below approximately 200 microns do not scatter visible light but will still scatter some UVA radiation. Thus the inclusion of nanoscale TiO_2 (anatase, rutile) or ZnO in sunscreens has the consumer-desired goal of a clear sunscreen with UV-absorbing properties. The surfaces of nanocrystals of TiO_2 can generate ROS and also can be cytotoxic.⁵⁵⁻⁵⁷

In order ENM manufacturers to avoid the generation of ROS by commercial products with anatase TiO_2 nanoparticles are covered with inert oxides SiO_2 , Al_2O_3 or zirconium.⁵⁸ But, recent studies showed that under UV irradiation sunscreen with TiO_2 produce ROS.⁵⁹

Some studies investigated skin penetration by nanoscale TiO_2 . In a study scientists applied TiO_2 into human skin either as an aqueous suspension or oil-in-water emulsion and evaluated skin penetration. They observed that TiO_2 apparently penetrated skin when applied as an oil-in-water emulsion, and that penetration was greater when applied to hairy skin, suggesting surface penetration through hair follicles or pores.⁶⁰ Another study in human skin provided compelling evidence that nanoparticles can achieve epidermal and dermal penetration (microsphere 0.5-1.0 μm).⁶¹

Recent studies showed that nanoparticle skin studies display, increasingly, a multidisciplinary character (penetration, toxicity studies) but their results are often contradicting. Toxicologists recommend standardisation of available test systems and focusing on the correlating physicochemical nanoparticle properties to penetration potential. [39]. A study showed that UVB-damaged skin slightly enhanced TiO_2 nanoparticles or ZnO penetration in sunscreen formulations but no transdermal absorption was detected.⁶²

A recent review on the subject of skin penetration and dermal or percutaneous absorption of metal nanoparticles and their effect on skin (especially TiO_2 and ZnO) contain contradictory data.⁶³

Pulmonary toxicity of carbon Nanotubes (single-walled NT are graphite sheets rolled into tubes, 1 nm

in diameter and 1000 nm or more in length) have been studied in recent years. Some NT are capped at either end by half-fullerene domes to achieve great strength. Some nanotubes have a strong tendency to agglomerate by van der Waals forces into tangled ropes, whereas, others remain as a fine powder (much like carbon black.) is of great concern for exposure of many workers (in aerospace and other industries) and for consumers using miniature electronics. Under some conditions the NTs can reach the respiratory system and can penetrate deep into the lung. The NTs toxicity will also depend on whether they are persistent or cleared from the lung and whether the host can mount an effective response to sequester or dispose of the NT particles.⁶⁴

NTs were proved to be at least as toxic as quartz (SiO_2) and much more toxic than carbon black (a form of amorphous carbon from incomplete combustion of fuels that has a high surface-area-to-volume ratio), with some indication of the effect of metal content on toxicity. The redox properties of iron in SWNT were implicated in oxidative stress and cytotoxicity in cell cultures of human keratinocytes.⁶⁵

These studies and other experimental findings have implications for respiratory human risk assessment of NMs. Nanomaterials inhaled into the lungs (depending on their content) are capable of eliciting an inflammatory, granulomatous, and fibrogenic response. Scientists suggest that permissible exposure level (PEL) for respirable graphite dust (legislated many decades ago) may be inadequately protective for exposure to SWNTs (single wall nanotubes). *In vivo* experiments with mice that were exposed to airborne nanotubes at a concentration of 5 mg/m^3 , the PEL for respirable graphite dust, and 40% of the respired nanotubes deposited in the pulmonary region, the lungs would accumulate a mass of nanotubes equivalent to the low dose within 4 working days and a mass equivalent to the high dose within 17 working days. Moreover, because SWNTs were more toxic than quartz based on histopathology, assuming similar relative toxicity in humans, a PEL below that for quartz dust (0.05 mg/m^3) is suggested until further characterization of nanotube toxicity.⁶⁶

Some toxicological *in vivo* studies used rats, mice and hamsters that were exposed to fine-sized TiO_2 particles (300 nm), TiO_2 nanoscale rods or TiO_2 nanoscale dot particles (10 nm) at intratracheal instillation doses (1 to 5 mg/kg). Results have demonstrated no significant differences among any of the particle-exposed groups compared to vehicle controls with regard to inflammatory or cytotoxic lung responses at any post-exposure time periods.⁶⁷

A recent review on toxicological data of Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles focused on the respiratory system, showing the importance of inhalation as the primary route for exposure in the workplace and for consumer products. Oral exposure mainly occurs through food products containing TiO₂-additives. Most dermal exposure studies (*in vivo* or *in vitro*), report that TiO₂ do not penetrate the stratum corneum (SC). In the field of nanomedicine, intravenous injection can deliver TiO₂ nanoparticle carriers directly into the human body. Upon intravenous exposure, TiO₂ can induce pathological lesions of the liver, spleen, kidneys, and brain (at high concentration exposures). There is also an enormous lack of epidemiological data regarding TiO₂ nanoparticles. Long-term inhalation studies in rats have reported lung tumours.⁶⁸

Some other toxicological studies investigated the effects of various surface treatments (0–6% alumina [Al₂O₃] and/or 0–11% amorphous silica [SiO₂]) on the toxicity of commercial TiO₂ particle formulations. Pulmonary bioassay data from instillation exposures in rats to TiO₂ particle-type formulations (compared to reference base TiO₂ particle types). The TiO₂ particle formulations with the largest concentrations of both alumina and amorphous silica surface treatments produced mildly enhanced adverse pulmonary effects.⁶⁹

As noted from the various toxicological studies with nanomaterials, the relevant inhalation dosimetry in risk assessments of nanoparticles may be surface area or particle number rather than mass per volume or per body weight, although the complexity of other properties preclude generalizations to all nanoparticles.⁷⁰

Despite this complexity, some patterns are emerging for the more studied nanomaterial substances. The primary mechanism of action by inhalation or dermal routes appears to be free radical generation and oxidative stress associated with surface reactivity. Oxidative stress is associated with TiO₂ nanoparticles, for example, results in early inflammatory responses such as an increase in polymorphonuclear cells, impaired macrophage phagocytosis, and/or fibro-proliferative changes in rodents.⁷¹

Most toxicological studies with NMs have been *in vitro*, or in short-term *in vivo* studies involving unnatural delivery (e.g., intratracheal instillation) in limited species and types of nanoparticles.

The *National Toxicology Program* (NTP, established in 1978 in the Department of Health and Human Services) in the USA is an interagency program evaluating chemicals and agents of public health concern by applying tools of modern toxicology and molecular biology. The program maintains a

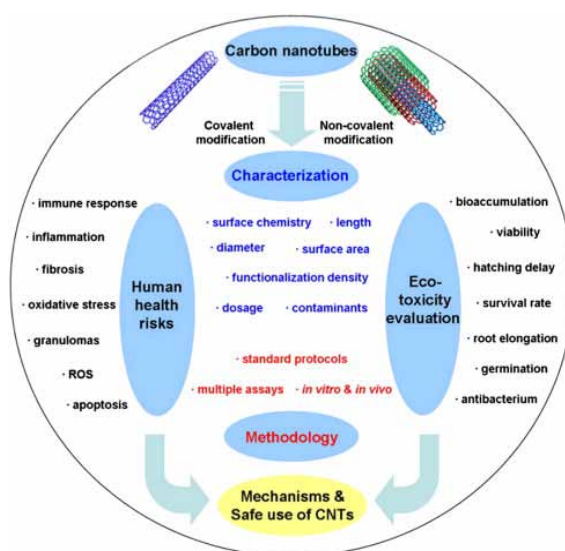


Figure 2. General Diagram for the CNTs of the human health risks,. Characterization, ecotoxicity evaluation, methodology, mechanisms and safe use of CNTs

science-based approach in dealing with critical issues in toxicology. To that end, the NTP is continually evolving to remain at the cutting edge of scientific research. The NTP is planning short and long-term studies, including oral, dermal, and inhalation exposures for some nanoparticles (<http://ntp-server.niehs.nih.gov/files/nanoscale05.pdf>). Nanomaterial research and risk assessments will ultimately need to address multiple potential health effects including cardiovascular, carcinogenicity, reproductive/developmental, immunological, and neurological.⁷²

8. Conclusions

Nanotechnology has gained a great deal of public interest due to the needs and applications of nanomaterials in many areas of human endeavors including industry, medicine and public health. Environmental exposure to nanomaterials is inevitable as nanomaterials become part of our daily life. In the last ten years nanotechnology applications were introduced in many consumer products and in various biomedical imaging techniques, pharmaceuticals, electronic and energy technologies. There is inevitably a heated debate among scientists for the future implications of nanotechnology. Also, ENMs raised concerns for toxicity and environmental pollution. These concerns have led to a debate among advocacy groups and governments on whether special regulation of nanotechnology is warranted. In the last years there were calls for tighter regulation of nanotechnology and more research related to the human health and safety risks.⁷³

Μηχανικά Νανοϋλικά για Καινοτόμες Βιοϊατρικές Εφαρμογές, Φαρμακευτικές Ουσίες, Προϊόντα Προσωπικής Φροντίδας και Προστασίας Δέρματος.

Τοξικολογικά Προβλήματα και Εκτίμηση Κινδύνου για τον Άνθρωπο

Θωμάς Βλαχογιάννη, Σταμάτιος Περδικάρης και
Αθανάσιος Βαλαβανίδης

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, 15784 Αθήνα
Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, 16784 Αθήνα

Περίληψη

Η νανοτεχνολογία στον 21^ο αιώνα είναι ο επιστημονικός τομέας της τεχνολογίας που περιλαμβάνει τον έλεγχο των υλικών σε ατομικό και μοριακό επίπεδο. Οι χημικές ενώσεις θεωρούνται ότι είναι σε διαστάσεις νανο-όταν είναι περίπου 100 nm ή μικρότερες σε μέγεθος [το νανόμετρο (nm) αντιστοιχεί σε ένα δισεκατομμυριοστό του μέτρου]. Η νανοτεχνολογία προσφέρει ένα μεγάλο εύρος δυνατοτήτων για την ανάπτυξη καινοτόμων προϊόντων και εφαρμογών σε διάφορους τομείς της βιοϊατρικής, φαρμακευτικής, βιολογίας, τροφίμων, ενέργειας και ηλεκτρονικών συσκευών. Τα τελευταία χρόνια χιλιάδες επιστήμονες και τεχνολόγοι εργάζονται στη έρευνα και ανάπτυξη καινοτόμων νανοϋλικών. Για το μέλλον η νανοτεχνολογία φαίνεται ότι δεν έχει όρια και επεκτείνεται με άλματα σε όλους τους τομείς που επηρεάζουν την καθημερινή ζωή μας. Τα μηχανικά νανοϋλικά έχουν βρει πρακτικές εφαρμογές σε πολλά καταναλωτικά προϊόντα, όπως καλλυντικά, υφάσματα, διαγνωστικές μεθόδους, προϊόντα προσωπικής φροντίδας, χρώματα κ.λπ. Ενώ άλλες εφαρμογές καλύπτουν τομείς τροφίμων, ενέργειας, υπολογιστών, φορητών τηλεφώνων κ.λπ. Οι εκπληκτικές αυτές ιδιότητες οφείλονται αποκλειστικά στο μικρό μέγεθος, σχήμα και τις εξαιρετικές ιδιότητες (ηλεκτρονικές, οπτικές, μαγνητικές, μηχανικές και χημικές). Στην επισκόπηση αυτή επικεντρώνουμε την προσοχή μας στις κυριότερες βιοϊατρικές εφαρμογές, τα φαρμακευτικά προϊόντα, τα προϊόντα προσωπικής φροντίδας, την προστασία του δέρματος. Η επισκόπηση επικεντρώνεται στις πρόσφατες επιστημονικές έρευνες της επιστημονικής βιβλιογραφίας και την ποικιλία των εφαρμογών τους. Επίσης εξετάζουμε σε αρκετή έκταση τα τοξικολογικά προβλήματα στον άνθρωπο από την έκθεση σε νανοϋλικά, καθώς και τον τομέα της υγιεινής και ασφάλειας των νανο-προϊόντων στους εργαζόμενους των βιομηχανιών και στους καταναλωτές.

Αλληλογραφία: Δρ. Θωμάς Βλαχογιάννη. E-mail: thvlach@chem.uoa.gr & vlachogianni@mio-ecsde.org

References

1. Wilson M, Kannangara K, Smith, G, Simmons, M, Raguse, B. (2002) *Nanotechnology: Basic Science and Emerging Technologies*. Chapman and Hall/CRC; Boca Raton, FL..
2. Drexler, K. E. (1986.) *Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology*. Doubleday,
3. Drexler, K. E. (1992) *Nanosystems: Molecular Machinery, Manufacturing, and Computation*. New York: John Wiley & Sons, New York.
4. Royal Society and Royal Academy of Engineering. Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties. RS Policy Document 19/04 London, July 2004. www.royalsoc.ac.uk, or www.raeng.org.uk .Retrieved March 2013.
5. National Nanotechnology Initiative. Collaborative central point of Federal Agencies in the USA (Arlington, VA, USA, www.nano.gov/about-nni, established in 2000).
6. European Commission Research DG, Unit G4. Nanosciences and Nanotechnologies. Some Figures about Nanotechnology R & D in Europe and Beyond, Dec. 2005, [[ftp://ftp.cordis.europa.eu/pub/nanotechnology/docs/nano_funding_data_08122005.pdf](http://ftp.cordis.europa.eu/pub/nanotechnology/docs/nano_funding_data_08122005.pdf)].]
7. Cientifica Ltd. Global Funding of Nanotechnology and Its Impact, July 2011, 69 Brushfield St London E1 6AA, UK <http://cientifica.com/wp-content/uploads/downloads/2011/07/Global-Nanotechnology-Funding-Report-2011.pdf>]
8. OECD/NNI, Organization for Economic Co-operation and Development/National Nanotechnology Initiative. International Symposium on Assessing Impact of Nanotechnology, 27-28 March 2012, Washington DC (assessed by March 2013, http://www.nano.gov/sites/default/files/dsti_stp_nano201215.pdf).
9. The Woodrow Wilson International Center for Scholars' Project on Emerging Nanotechnologies, established 2005, 1300 Pennsylvania Ave., N.W. Washington, D.C. [www.nanotechproject.org , www.wilsoncenter.org/nano].
10. United States Government Accountability Office (GAO). Report. Nanotechnology. Nanomaterials Are Widely Used in Commerce, but EPA Faces Challenges in Regulating Risk GAO Publs, 10-549, Washington DC, May 2010 (www.gao.gov/new.items/d10549.pdf).
11. European Commission, Research Directorate General, Directorate. Outcome of the Workshops Organised by the EC. *Future Needs and*

Challenges for Material and Nanotechnology Research. European, Directorate-G/Unit 3.-Brussels, October, 2001 (<http://cordis.lu/nanotechnology/>).

12. Hall J.S (2005). *Nanofuture: What's Next For Nanotechnology*. Prometheus Books , Amherst, New York.
13. Hall J.S. (2005) *Nanofuture: What's Next for Nanotechnology*. Prometheus Books, Amherst, New York,.
14. O'Mathuna D.P. (2009) *Nanoethics. Big Ethical Issues with Small Technology (Think Now)*. Prometheus Books, (Continuum Intern. Pubs Group) Amherst, New York,.
15. Demchenko A.P. Nanoparticles and nanocomposites for fluorescence sensing and imaging. *Methods Appl. Fluoresc.* 1, 1-28, 2013.
16. Willets K.A., Van Duyne R.P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Ann. Rev. Phys. Chem.* 58, 267-297, 2007.
17. Homola J. (2006) (Ed) . *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*. Springer, Berlin.
18. Gupta A.K, Naregalkar R.R, Valdy V.D, Gupta M. Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. Review. *Nanomedicine* 2, 23-39, 2007.
19. Bianco A. Kostarelos K, Prato M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current Opin. Chem. Biol.* 9, 674-679, 2005.
20. Liu Z, Chen K, Davis C, Sherlock S, Cao Q, Chen X, Dai H. Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment. *Cancer Res.* 68, 6652-6660, 2008.
21. Gardikis K, Micha-Screttas M, Demetzos C, Steele B.R. Dendrimers and the development of new complex nanomaterials for biomedical applications. *Curr. Med. Chem.* 19, 4913-28, 2012.
22. Huh A.J, Kwon Y.J. Nanoantibiotics: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Control Release.* 156, 128-45, 2011.
23. Barreto J.A, O'Malley W, Kubeil M, Graham B, Stephan H, Spiccia L. Nanomaterials: Applications in Cancer Imaging and Therapy. Review. *Advanced Health Materials* 23, H18-H40, 2011.
24. Ma Z., Kotaki M., Inai R., Ramakrishna S. Potential of Nanofiber Matrix as Tissue-Engineering Scaffolds. *Tissue Engineer.* 11, 101-109, 2005.
25. MacDoonald R.A., Laurenzi B.F, Viswanathan G., Ajayan P.M., Stegemann J.P. Collagen-carbon nanotube composite materials as scaffolds in tissue engineering. *J. Biomed. Mat. Res. Part A* 74A, 489-496, 2005.
26. Sapsford K.E, Pons T., Medintz I.L., Mattoussi H. Biosensing with luminescent semiconductor quantum dots. Review. *Sensors* 6, 925-953, 2006.
27. Li S., Singh J., Li H., Banerjee I.A. (2011) *Front Matter, Biosensor Nanomaterials*. Wiley-VCH, (on line) (DOI:10.1002/9783527635160)
28. Kumar C.S.S.R (Ed) (2011) *Nanomaterials for the Life Sciences*, 10 vol. Set. Wiley-VCH, Weinheim, (ISBN: 978-3-527-32261-9).
29. Kumar C. (Ed) (2007) *Nanomaterials for Medical Diagnosis and Therapy*. Wiley-VCH, Weinheim,.
30. Merkoci A. (Ed) (2009) *Biosensing Using Nanomaterials*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA,.
31. Fadeel B., Pietrousti A., Shvedova A.A. (Eds) (2012). *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials. Exposure, Toxicology, and Impact on Human Health*. Academic Press (Elsevier imprint), Waltham, MA, USA.
32. Jones E. The benefits of silver in hygiene, personal care and health care. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 147-52, 2009.
33. Guglielmini G. Nanostructured novel carrier for topical application. *Clin. Dermatol.* 26, 341-346, 2008.
34. Nohynek G.J., Dufour E.K. Nano-sized cosmetic formulations or solid nanoparticles in sunscreens: a risk to human health? *Arch. Toxicol.* 86, 1063-1075, 2012.
37. Kaur I.P., Agrawal R. Nanotechnology: a new paradigm in cosmoceuticals. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* 1, 171-182, 2007.
36. Somasundaran P., Chakraborty S., Qiang Q., Deo P., Wang J., Zhang R. Surfactants, polymers and their nanoparticles for personal care applications. *J. Cosmet. Sci.* 55(Suppl), S1-S17, 2004.
37. European Food Safety Authority. *Guidance of the Scientific Committee/Scientific Panel On request from: European Com-mission* Question number: EFSA-Q-2009-00942 Adopted: 06 April 2011. Published: 10 May 2011. Affiliation: European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, 2011.
38. European Commission. Scientific Committee on Consumer Safety. *Full Guidance on the Safety Assessment of Nanomaterials in Cosmetics* (July 2012) [http://ec.europa.eu/health/scientific_

- committees/ consumer_safety/docs/sccs_s_005.pdf].
39. U.S. Food and Drug Administration (FDA). New Hampshire Av., Silver Spring, MD 20993 [http://www.fda.gov/ ScienceResearch/ SpecialTopics/ Nanotechnology/default.htm].
 40. U.S. Food and Drug Administration. Draft Guidance for Industry: Safety of Nanomaterials in Cosmetic Products. April 2012 This document provides guidance to industry and other stakeholders (e.g., academia, other regulatory groups) on FDA's current thinking on the safety assessment of nanomaterials in cosmetic products].
 41. Friends of the Earth. Nanotechnology. FoE International is the world's largest federation of environmental organisations with member groups in 77 countries. [http://nano.foe.org.au/].
 42. Kuempel E.D., Geraci C.L., Schulte P.A. Risk assessment and risk management of nanomaterials in the workplace: translating research to practice. Review. *Ann. Occup. Hyg.* 56,491-505, 2012.
 43. Ling M.P., Lin W.C., Liu C.C., Huang Y.S., Chueh M.J., Shih T.S. Risk management strategy to increase the safety of workers in the nanomaterials industry. *J. Hazard. Mater.* 229-230, 83-93, 2012.
 44. Castranova V. Schulte, P.A. Zumwalde R.D. Occupational nanosafety considerations for carbon nanotubes and carbon nanofibers. *Acc. Chem.. Res.* 46, 642-649, 2013.
 45. National Institute of Occupational Safety and Health (USA). 10 Critical Topic Areas in Nanotechnology to guide in addressing knowledge gaps, developing strategies, and recommendations [http://www.cdc.gov/niosh/topics/nanotech/critical.html]. (Accessed 15.4.2013)
 46. NIOSH. Approaches to Safe Nanotechnology: Managing the Health and Safety Concerns Associated with Engineered Nanomaterials. NIOSH, Washington DC, No. 2009-125. 2009 [http://www.cdc.gov/niosh/docs/2009-125/].
 47. Health and Safety Executive (HSE) (2013). Guidance: "Using Nanomaterials at Work". Including Carbon Nanotubes (CNTs) and other Bio-persistent High Aspect Ratio Nanomaterials (HARNs). Series code HSG272. HSE Publications, London,.
 48. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (Federal Institute for Occupational Safety and Health) BAuA/VCI/BDI/BMBF-survey 2011: Second survey on aspects of worker protection during the production and handling of engineered nanomaterials (in German), 2011.
 49. IUTA, BAuA, BG RCI, IFA, TUD, VCI, 2011: Tiered Approach to an Exposure Measurement and Assessment of Nanoscale Aerosols Released from Engineered Nanomaterials in Workplace Operations (PDF file, 2 MB), 2011.
 50. Federal Environment Agency (Umwelt Bundes Amt, UBA), Federal Institute for Risk Assessment (Bundesinstitut für Risikobewertung, BfR), Federal Institute for Occupational Safety and Health (Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, BAuA). Nanomaterials and REACH. Background Paper on the Position of German Competent Authorities, 2011.
 51. Sonkaria S., Ahn S.H., Khare V. Nanotechnology and its impact on food and nutrition: A review. *Recent Pat Food Nutr Agric.* 4, 8-18, 2012 .
 52. Tsuji J.S., Maynard A.D., Howard P.C., James, J.T., Lam C.-W., Warheit D.B., Santamaria A.B. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part IV: Risk assessment of nanoparticles. *Toxicolog. Sci.* 89, 42-50, 2006.
 53. Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113, 823-839, 2005.
 54. Konaka R., Kasahara E., Dunlap W.C., Yamamoto Y., Chien K. C., Inoue M. Irradiation of titanium dioxide generates both singlet oxygen and superoxide anion. *Free Rad.. Biol. Med.* 27, 294-300, 1999.
 55. Uchino T., Tokunaga H., Ando M., Utsumi H. Quantitative determination of OH radical generation and its cytotoxicity induced by TiO₂-UVA treatment. *Toxicol. In Vitro* 16, 629-635, 2002.
 56. Zhang A.-P., Sun Y.-P. Photocatalytic killing effect of TiO₂ nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells. *World J. Gastroenterol.* 10L, 3191-3193, 2004.
 57. Mills A., Le Hunte S. An overview of semiconductor photocatalysis. *J. Photochem. Photobiol. A* 108, 1-35, 1997.
 58. Brezová V., Gabčová S., Dvoranová D., Staško A. Reactive oxygen species produced upon photoexcitation of sunscreens containing titanium dioxide (an EPR study). *J. Photochem. Photobiol. B* 79, 121-134, 2005.
 59. Bennat C., Müller-Goymann C. C. Skin penetration and stabilization of formulations

- containing microfine titanium dioxide as physical UV filter. *Int. J. Cosmet. Sci.* 22, 271–283, 2000.
60. Tinkle S. S., Antonini J.M., Rich B. A., Roberts J. R., Salmen R., DePree K., Adkins E.J. Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ. Health Perspect.* 111, 1202–1208, 2003.
 61. Smijs T.G., Bouwstra J.A. Focus on skin as a possible port of entry for solid nanoparticles and the toxicological impact. *J. Biomed. Nanotechnol.* 6, 469-484, 2010.
 62. Monteiro-Riviere N.A., Wiench K., Landsiedel R., Schulte S., Inman A.O., Riviere J.E. Safety evaluation of sunscreen formulations containing titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in UVB sunburned skin: an in vitro and in vivo study. *Toxicol. Sci.* 123, 264-280, 2011.
 63. Crosera M., Bovenzi M., Maina G., Adami G., Zanette C., et al. Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature. *Int Arch. Occup. Environ. Health.* 82,1043-1055, 2009.
 64. Lam C.-W., James, J. T., McCluskey R., Hunter R. L. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci.* 77, 126–134, 2004.
 65. Shvedova A. A., Castranova V., Kisin E. R., Schwegler-Berry D., Murray A. R., Gandelsman V. Z., Maynard A., Baron, P. Exposure to carbon nanotube material: Assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J.Toxicol. Environ. Health A.* 66, 1909–1926, 2003.
 66. Maynard A.D., Zimmer A.T. Evaluation of grinding aerosols in terms of alveolar dose: The significance of using mass, surface-area and number metrics. *Ann. Occup. Hyg.* 46 (Suppl. 1), 320–322, 2002.
 67. Bermudez E., Mangum J. B., Wong B. A. Asgharian B. Hext P. et al. Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol. Sci.* 77, 347–357, 2004.
 68. Shi H., Magaye R., Castranova V., Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol.* 10,15, 2013.
 69. Warheit D. B., Laurence B. R., Reed K. L., Roach D. H., et al. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol. Sci.* 77,117–125, 2004.
 70. Yamamoto A., Honma R., Sumita M., Hanawa T. Cytotoxicity evaluation of ceramic particles of different sizes and shapes. *J. Biomed. Mater. Res.* 68, 244–256, 2003.
 71. Hamilton R.F., Wu N., Porter D., Buford M., Wolfarth M., Holian A. Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. *Part Fibre Toxicol* 6:35, 2009.
 72. National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) and National Toxicology Program (NTP). N. Walker. *Activities Evaluating the Safety of Nanoscale Materials*. US-EUWorkshop. Research Triangle, North Carolina, USA, 2011. [<http://www.steptoe.com/assets/htmldocuments/NIEHS-NTP%20Activities%20Evaluation%20the%20Safety%20of%20Nanoscale%20Materials.pdf>]
 73. Vlachogianni T., Fitakis K., Loridas S., Perdicaris S., Valavanidis A. Potential toxicity and safety evaluation of nanomaterials for the respiratory system and lung cancer. *Lung Cancer:Target and Therapy* 4:71-82, 2013.

Ορθολογική Προσέγγιση για την Ανακάλυψη Ενώσεων-Οδηγών με τη Χρήση Φαρμακοφόρων Μοντέλων. Χρήση της Τράπεζας Ενώσεων Zinc στην Εικονική Σάρωση (Virtual Screening)

Ελένη Κουλουρίδη¹, Thierry Langer², Sharon D. Bryant² και Θωμάς Μαυρομούστακος¹

¹Τομέας Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α. Πανεπιστημιούπολη, 157 71, Αθήνα

²Inte: Ligand Softwareentwicklungs und Consulting GmbH Mariahilferstrasse 74B/11 Vienna 1070, Austria

Περίληψη

Στο παρόν άρθρο ανασκόπησης περιγράφεται ο ρόλος του φαρμακοφόρου μοντέλου στην ανακάλυψη καινοτόμων φαρμακευτικών μορίων και οι μεθοδολογίες δημιουργίας του, με βάση την πιθανή βιοδραστική διαμόρφωση του προσδέματος αναφοράς (ligand-based) και με βάση την πιθανή βιοδραστική διαμόρφωση του προσδέματος στο σύμπλεγμα προσδέματος-βιολογικού στόχου (structure-based). Επίσης, περιγράφονται οι δυσκολίες που παρουσιάζουν οι δύο μεθοδολογίες. Δίνεται παράδειγμα χρήσης ενός φαρμακοφόρου μοντέλου στη διαδικασία της εικονικής σάρωσης και των προβλημάτων που αντιμετωπίζονται για τη δημιουργία του. Παρουσιάζεται το λογισμικό LigandScout, της εταιρίας Inte:Ligand που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία φαρμακοφόρων μοντέλων με τη χρήση των δύο μεθοδολογιών. Γίνεται εκτεταμένη περιγραφή της βιβλιοθήκης ενώσεων Zinc και της εφαρμογής που παρέχεται από την εταιρία Molinspiration για τον υπολογισμό των μοριακών ιδιοτήτων μιας ένωσης καθώς και την πιθανότητα βιοδραστικότητάς της σε συγκεκριμένους βιολογικούς στόχους.

Λέξεις-κλειδιά: Ορθολογική προσέγγιση, Φαρμακοφόρο μοντέλο, LigandScout, Zinc, Molinspiration.

1. Εισαγωγή

Η έννοια του φαρμακοφόρου

Ο πρώτος ορισμός της έννοιας του φαρμακοφόρου δόθηκε το έτος 1909 από τον Ehrlich, ο οποίος όρισε ως φαρμακοφόρο ένα μοριακό σκελετό που φέρει τα απαραίτητα δομικά χαρακτηριστικά τα οποία θεωρούνται υπεύθυνα για τη βιολογική δράση ενός φαρμάκου.¹ Ο πιο πρόσφατος ορισμός του φαρμα-

κοφόρου έχει δοθεί από τη Διεθνή Ένωση Εφαρμοσμένης Χημείας (International Union of Applied Chemistry-IUPAC). Σύμφωνα με αυτόν, το φαρμακοφόρο ορίζεται ως το σύνολο των στερεοηλεκτρονικών χαρακτηριστικών που είναι απαραίτητα για να διασφαλίσουν τη βέλτιστη αλληλεπίδραση ενός φαρμάκου και ενός συγκεκριμένου βιολογικού στόχου και που έχουν ως αποτέλεσμα την έναρξη λειτουργίας του βιολογικού στόχου ή την αναστολή λειτουργίας αυτού.²

2. Ορθολογική προσέγγιση για την ανακάλυψη ενώσεων-οδηγών με τη χρήση φαρμακοφόρων μοντέλων

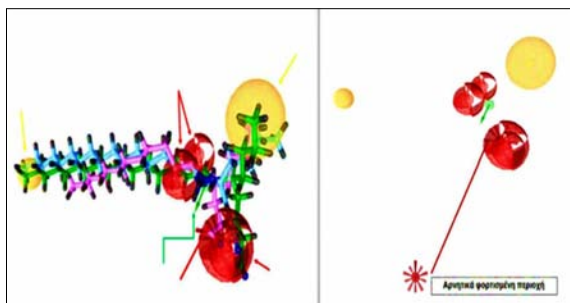
Ένας νέος ορθολογικός τρόπος προσέγγισης για την ανακάλυψη καινοτόμων φαρμακευτικών ουσιών αποτελεί αυτός της χρήσης φαρμακοφόρων μοντέλων.

Εφαρμόζονται δύο μεθοδολογίες για τη δημιουργία φαρμακοφόρου μοντέλου :

(α) Δημιουργία φαρμακοφόρου με βάση την πιθανή βιοδραστική διαμόρφωση του προσδέματος αναφοράς (ligand-based).

Η προσέγγιση αυτή δεν απαιτεί τη γνώση της τρισδιάστατης δομής του μακρομορίου στόχου. Η δημιουργία του φαρμακοφόρου βασίζεται στην εξαγωγή των κοινών δομικών, διαμορφωτικών και στερεοηλεκτρονικών χαρακτηριστικών παρεμφερών ενώσεων με αυτών του μορίου αναφοράς που λειτουργεί ως υπόστρωμα, χαρακτηριστικά τα οποία θεωρούνται υπεύθυνα για την βιοδραστικότητά τους. (Σχήμα 1)

Οι προσεγγίσεις που είναι γνωστές ως CoMFA (Comparative Field Analysis)³ και CoMSIA (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis)⁴ ανήκουν σε αυτή την μεθοδολογία.

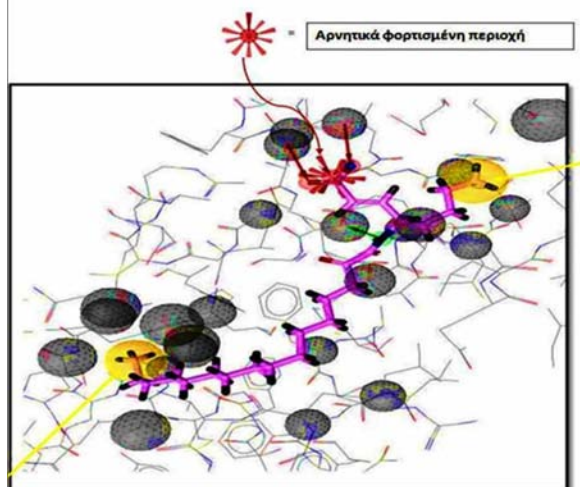


Σχήμα 1: Φαρμακοφόρο μοντέλο που δημιουργήθηκε με βάση την πιθανή βιοδραστική διαμόρφωση του προσδέματος αναφοράς. Στο Σχήμα παριστάνεται το φαρμακοφόρο στο οποίο υπερτίθενται οι αναστολείς. Το φαρμακοφόρο αυτό μοντέλο αποτελείται από δύο υδρόφοβα χαρακτηριστικά (κίτρινες σφαίρες), ένα δότη δεσμού υδρογόνου (πράσινο βέλος), τέσσερις δέκτες δεσμού υδρογόνου (κόκκινες σφαίρες), και μία αρνητικά φορτισμένη περιοχή.

(β) Δημιουργία φαρμακοφόρου με βάση την πιθανή βιοδραστική διαμόρφωση του προσδέματος στο σύμπλεγμα προσδέματος-βιολογικού στόχου (structure-based).

Η προσέγγιση αυτή βασίζεται στη γνώση i) της τρισδιάστατης απεικόνισης του μακρομορίου στόχου χωρίς την παρουσία κάποιου προσδέματος (“macromolecule (without ligand) based”) ή ii) συνηθέστερα της τρισδιάστατης απεικόνισης του συμπλέγματος (complex) μακρομορίου-προσδέματος (“macromolecule-ligand-complex based”). Η τρισδιάστατη απεικόνιση λαμβάνεται συνήθως μέσω της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X ή της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού. Η υπέρθεση των μορίων στην περίπτωση αυτή γίνεται στο ενεργό, καταλυτικό ή αλλοστερικό κέντρο του υποδοχέα, νουκλεϊνικού οξέος ή βιολογικής μεμβράνης.⁵ Στο Σχήμα 2 παρουσιάζεται το φαρμακοφόρο μοντέλο που προέκυψε με βάση τη μοριακή πρόσδεση βιοδραστικού αναστολέα της cPLA₂ κάνοντας χρήση της μεθοδολογίας της επαγόμενης προσαρμογής.

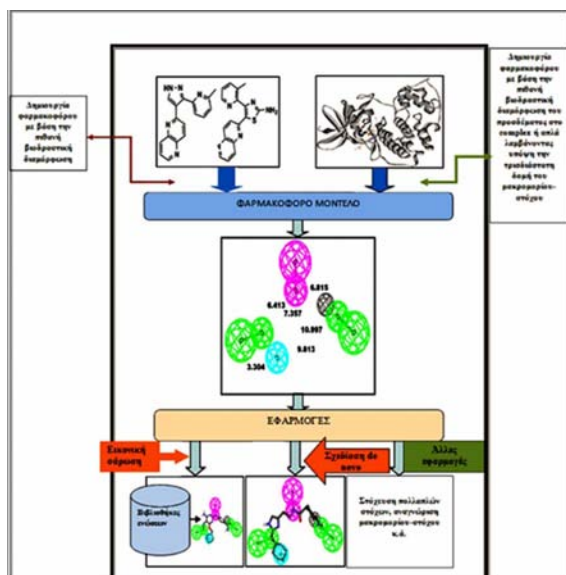
Οι δύο προαναφερόμενες προσεγγίσεις για την εξαγωγή φαρμακοφόρου μοντέλου έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στις διαδικασίες εικονικής σάρωσης (virtual screening), στο *de novo* σχεδιασμό, και σε άλλες εφαρμογές όπως και στην ‘πολυφαρμακολογία’ όπου ο σχεδιασμός φαρμάκων απαιτεί τη στόχευση πολλαπλών στόχων (multitarget drug design) (Σχήμα 3). Η πρόοδος της υπολογιστικής χημείας (computational chemistry) τα τελευταία είκοσι χρόνια προσέφερε στη φαρέτρα του θεωρητικού φαρμακοχημικού μια μεγάλη ποικιλία ερευνητικών μεθοδολογιών στην εφαρμογή δημιουργίας ακριβέστερων φαρμακοφόρων μοντέλων.⁵⁻⁸



Σχήμα 2: Εικόνα φαρμακοφόρου μοντέλου με βάση την τρισδιάστατη (3D) δομή του συμπλέγματος μακρομορίου-προσδέματος. Το φαρμακοφόρο μοντέλο σε αυτή την περίπτωση αποτελείται από δύο υδρόφοβα χαρακτηριστικά (κίτρινες σφαίρες), δύο δέκτες δεσμών υδρογόνου (κόκκινα βέλη), ένα δότη δεσμών υδρογόνου (πράσινο βέλος) και μία αρνητικά φορτισμένη περιοχή. Οι γκρι σφαίρες αναπαριστούν τις στεरिकές παρεμποδίσεις που υπάρχουν στην ενεργό περιοχή.

2.1 Περιγραφή της μεθοδολογίας ανακάλυψης φαρμακοφόρου με βάση τη δομή του προσδέματος-βιολογικού στόχου

Στη μεθοδολογία αυτή εντοπίζεται η περιοχή πρόσδεσης και προσδιορίζονται οι αλληλεπιδράσεις-κλειδιά μεταξύ προσδέματος-βιολογικού στόχου. Το LigandScout είναι ένα λογισμικό με το οποίο κυρίως εφαρμόζεται η μεθοδολογία δημιουργίας



Σχήμα 3: Περιγραφή της δημιουργίας ενός φαρμακοφόρου μοντέλου και εφαρμογές αυτού.^{6,7}

γίας φαρμακοφόρου με βάση τη δομή του προσδέματος. Άλλα προγράμματα που δημιουργούν φαρμακοφόρα μοντέλα στηριζόμενα στο σύμπλεγμα προσδέματος-βιολογικού στόχου είναι τα Pocket v.2 και GBPM.

Στην περίπτωση που δεν υφίσταται τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλέγματος μακρομορίου στόχου με πρόσδεμα, η δυσκολία δημιουργίας φαρμακοφόρου αντιμετωπίζεται επιτυχώς λαμβάνοντας υπόψη μόνο την τρισδιάστατη απεικόνιση του μακρομορίου-βιολογικού στόχου, εφόσον αυτή υφίσταται. Παράδειγμα αυτού του τρόπου προσέγγισης, αποτελεί η μέθοδος ανάπτυξης φαρμακοφόρου με βάση τη δομή SBP (Structure-Based Pharmacophore) που εφαρμόστηκε με το λογισμικό Discovery Studio (Accelrys Inc.).⁶ Οι LUDI (LUDI=λογισμικό) χάρτες αλληλεπιδράσεων στο ενεργό κέντρο του μακρομορίου, οι οποίοι εστιάζουν στις λειτουργικές ομάδες που θα μπορούσαν να δώσουν αλληλεπιδράσεις με κάποιο μικρό μόριο⁸, μετατρέπονται σε φαρμακοφόρο μοντέλο Catalyst (Catalyst: λογισμικό), το οποίο περιλαμβάνει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, δότες δεσμών υδρογόνου και δέκτες δεσμών υδρογόνου.

Προβλήματα, που εμφανίζονται εφαρμόζοντας τη μεθοδολογία εξεύρεσης φαρμακοφόρου με βάση τη δομή του προσδέματος-βιολογικού στόχου, έχουν σχέση με τον αριθμό των αλληλεπιδράσεων που προκύπτουν για μια συγκεκριμένη περιοχή πρόσδεσης στο μακρομόριο στόχο. Φαρμακοφόρο μοντέλο αποτελούμενο από αναπαραστάσεις αλληλεπιδράσεων περισσότερες από επτά δεν είναι κατάλληλο για πρακτικές εφαρμογές, όπως για παράδειγμα για την εικονική σάρωση μιας μεγάλης βιβλιοθήκης ενώσεων, γιατί με αυτό τον τρόπο καθίσταται εξαιρετικά δύσκολο να βρεθεί λύση που να ικανοποιεί την υπόθεση που θέτει το φαρμακοφόρο μοντέλο.⁶

Σε ένα φαρμακοφόρο μοντέλο κατανοείται η μοριακή βάση πρόσδεσης με το μακρομόριο, όχι μόνο της συγκρυσταλλωμένης ένωσης αναφοράς, αλλά και για οποιαδήποτε άλλη άγνωστη ένωση που έχει τη δυνατότητα εμφάνισης των συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων (π.χ. δότες δεσμών, θετικά/αρνητικά φορτισμένα άτομα κ.ά.). Με τον τρόπο αυτό γίνεται εφικτό να ερευνηθούν μεγάλες βιβλιοθήκες ενώσεων, με απώτερο σκοπό την ανακάλυψη πρωτότυπων ενώσεων, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως οδηγοί (lead compounds) προκειμένου να διευκολύνουν την ανακάλυψη φαρμάκων με επιθυμητές ιδιότητες.⁹ Η ευρέως εφαρμοζόμενη αυτή μεθοδολογία έχει παρουσιάσει αρκετές επιτυχίες τα τελευταία χρόνια, όπως για παράδειγμα την ανακάλυψη πρωτότυπων αναστολέων της DNA γυράσης.¹⁰

2.2 Περιγραφή της μεθοδολογίας ανακάλυψης φαρμακοφόρου με βάση τον προσδέτη

Η μεθοδολογία αυτή βασίζεται στη δημιουργία πολλαπλών διαμορφώσεων για κάθε ενεργό μόριο ώστε να διασφαλιστεί η διαμορφωτική του ευελιξία για κατάληψη του διαμορφωτικού χώρου (conformational space), ιδιαίτερα όταν δεν υπάρχουν δεδομένα συγκρυστάλλωσης υποδοχέα-προσδέματος.

Εκτός από την ανίχνευση της βιοδραστικής διαμόρφωσης των προσδεμάτων, ένα άλλο πρόβλημα στην εφαρμογή της μεθοδολογίας αυτής είναι η μη ύπαρξη ικανοποιητικού αριθμού βιολογικών δεδομένων για την επιλογή των μορίων εκγύμνασης (training set) με βάση τα οποία θα δημιουργηθεί το φαρμακοφόρο μοντέλο. Τα μόρια εκγύμνασης απαιτείται να παρουσιάζουν βιοδραστικότητα ως προς το μακρομόριο που μελετάται κάθε φορά.⁶ Για την αξιολόγηση ενός φαρμακοφόρου μοντέλου που δημιουργείται με τη μεθοδολογία αυτή, συνηθίζεται να χρησιμοποιούνται και μόρια τα οποία δεν παρουσιάζουν δράση και είναι δομικά παρεμφερή με αυτά που μελετώνται (decoys-παραπλανητικά).¹¹ Με τον τρόπο αυτό καθίσταται δυνατό να εκτιμηθεί εάν στο φαρμακοφόρο μοντέλο δύναται να “αναγνωρίζονται” οι ενώσεις που παρουσιάζουν βιολογική δράση και να απορρίπτονται τα ανενεργά μόρια.⁹

Υπάρχουν πολλά λογισμικά που υποστηρίζουν την τεχνική αυτή δημιουργίας φαρμακοφόρου μοντέλου όπως τα HipHop, PHASE, MOE κ.ά.

3. Διαδικασία εικονικής σάρωσης με βάση το φαρμακοφόρο μοντέλο

Όταν δημιουργηθεί ένα φαρμακοφόρο μοντέλο, βασισμένο στις δύο μεθοδολογίες που περιγράφονται στις ενότητες 2.1 και 2.2, τότε χρησιμοποιούνται βάσεις δεδομένων (compounds databases) για την εξεύρεση νέων προσδετών, διαδικασία η οποία ονομάζεται «εικονική σάρωση με βάση το φαρμακοφόρο *‘pharmacophore-based Virtual Screening’* (VS).¹² Οι ενώσεις, οι οποίες ικανοποιούν τα κριτήρια που τίθενται στο φαρμακοφόρο μοντέλο καλούνται «ενώσεις κρούσης» (hits). Είναι ενώσεις «νέοι οδηγοί», που μπορούν να οδηγήσουν σε φαρμακευτικά προϊόντα, αφού τροποποιηθούν δομικά ώστε να βελτιωθούν οι φυσικοχημικές και φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες.

Οι δυσκολίες που παρουσιάζονται κατά τη διαδικασία της εφαρμογής εικονικής σάρωσης οφείλονται σε δύο λόγους:

α) στη δημιουργία διαμορφώσεων για κάθε μόριο των προς μελέτη ενώσεων, και

β) στην αναγνώριση του φαρμακευτικού μοτίβου (pharmacophore pattern) δηλ. στην ανακάλυψη της

διαμόρφωσης εκείνης που ικανοποιεί τα περισσότερα κριτήρια του φαρμακοφόρου μοντέλου που χρησιμοποιείται ως “οδηγός”.

Το μεγαλύτερο πρόβλημα που προκύπτει όταν εφαρμοστεί η εικονική σάρωση, οφείλεται στο μικρό ποσοστό εξεύρεσης ενώσεων κρούσεων και από αυτές ενώσεων που να παρουσιάζουν τελικά βιολογική δράση. Αυτό αποδίδεται σε πολλούς λόγους, ένας από τους οποίους είναι το γεγονός ότι δεν μπορεί να ληφθεί υπόψη με τις τεχνικές που περιγράφηκαν προηγουμένως, η ευελιξία του μακρομορίου-στόχου.⁶

Παρακάτω δίνονται πληροφορίες για: α) το λογισμικό LigandScout και β) τη χρήση της βάσεως δεδομένων Zinc στην πειραματική διαδικασία της εικονικής σάρωσης.

4. Περιγραφή βασικών σημείων του προγράμματος LigandScout

Το LigandScout είναι ένα λογισμικό της εταιρείας Inte:Ligand που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία φαρμακοφόρων μοντέλων και με τις δύο μεθοδολογίες που έχουν περιγραφεί. Αποτελείται από τέσσερα τμήματα (perspectives) στα οποία εκτελούνται διαφορετικές φύσεως εργασίες και παρέχονται ποικίλες δυνατότητες στους χρήστες για τη συλλογή των απαραίτητων πληροφοριών. Στον παρακάτω Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα τμήματα του λογισμικού LigandScout και οι λειτουργίες που εκτελούνται σε αυτά.

Πίνακας 1: Τμήματα και λειτουργίες λογισμικού Ligandscout

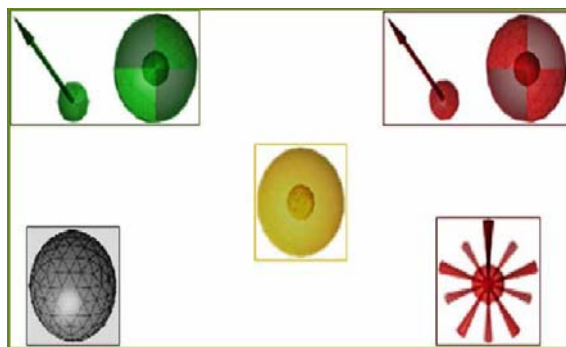
Τμήματα	Λειτουργίες
Structure-Based Modeling Perspective	Δημιουργία φαρμακοφόρου με βάση την (πιθανή) βιοδραστική διαμόρφωση του προσδέματος στο βιολογικό στόχο
Ligand-Based Modeling Perspective	Δημιουργία φαρμακοφόρου με βάση την πιθανή βιοδραστική διαμόρφωση του προσδέματος αναφοράς
Alignment Perspective	Υπερθέσεις μορίων και φαρμακοφόρων
Screening Perspective	Εικονική σάρωση με βάση το φαρμακοφόρο

Το φαρμακοφόρο μοντέλο που δημιουργείται από το λογισμικό LigandScout παριστάνεται με απεικονίσεις, οι οποίες υποδηλώνουν συγκεκριμένες

αλληλεπιδράσεις. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι απόρροια των αποστάσεων μεταξύ των ατόμων που μελετώνται, όπως επίσης του είδους των ατόμων και της μεταξύ τους γωνίας. Για παράδειγμα, ο δεσμός υδρογόνου επιτυγχάνεται εάν η απόσταση μεταξύ δύο ατόμων κυμαίνεται από 2,2-3,8 Å. Στο Σχήμα 4 που ακολουθεί δίνεται ο ορισμός απεικονίσεων που απαντώνται στα φαρμακοφόρα μοντέλα.

Παρακάτω επεξηγούνται οι διάφορες λειτουργίες του λογισμικού :

- Τμήμα με την ονομασία «*Structure-Based Modeling Perspective*» : Εισάγεται το σύμπλεγμα μακρομόριο-προσδέτης και αυτομάτως δημιουργείται το φαρμακοφόρο μοντέλο που αναπαριστά τις αλληλεπιδράσεις προσδέματος-μακρομορίου. Πριν τη δημιουργία του φαρμακοφόρου μοντέλου ελέγχεται απαραίτητα η δομή του προσδέτη γιατί μπορεί να υπάρχει ασυμβατότητα στον τύπο αρχείου .pdb με το λογισμικό LigandScout.
- Τμήμα με την ονομασία «*Ligand-Based Modeling Perspective*» : Εισάγονται οι προσδέτες που θα χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία του φαρμακοφόρου, δημιουργούνται πολλαπλές διαμορφώσεις αυτών με σκοπό τη διαμορφωτική ευελιξία για κατάληψη του διαμορφωτικού χώρου και ακολουθεί η δημιουργία του φαρμακοφόρου μοντέλου.
- Τμήμα με την ονομασία «*Alignment Perspective*» : Σε αυτό το τμήμα γίνονται υπερθέσεις φαρμακοφόρων ή / και φαρμακοφόρων / μορίων.
- Τμήμα με την ονομασία «*Screening Perspective*» : Τα φαρμακοφόρα που δημιουργούνται με τις με-



Σχήμα 4: Συμβολισμοί που απαντώνται στα φαρμακοφόρα μοντέλα με χρήση του λογισμικού LigandScout. Πράσινη σφαίρα ή βέλος: δότης δεσμού υδρογόνου, κόκκινη σφαίρα ή βέλος: δέκτης δεσμού υδρογόνου, γκρι σφαίρα : στεरिकές παρεμποδίσεις, κίτρινη σφαίρα: υδροφοβες αλληλεπιδράσεις, κόκκινο “αστέρι” : αρνητικά φορτισμένη περιοχή. Οι δότες ή δέκτες δεσμών υδρογόνου παριστάνονται με βέλος ή σφαίρες γιατί ο δεσμός υδρογόνου δεν εξαρτάται μόνο από την κατεύθυνση (βέλος) αλλά και από την απόσταση μεταξύ δύο ατόμων (σφαίρα).

θοδολογίες «Δημιουργία φαρμακοφόρου με βάση την (πιθανή) βιοδραστική διαμόρφωση του προσδέτη στο βιολογικό στόχο» και «Δημιουργία φαρμακοφόρου με βάση την πιθανή βιοδραστική διαμόρφωση του προσδέματος αναφοράς», μπορούν να «μεταφερθούν» σε αυτό το τμήμα μέσω του Copyboard Widget και να ακολουθήσει εικονική σάρωση με βάση το φαρμακοφόρο οποιασδήποτε βιβλιοθήκης ενώσεων επιλέξει ο χρήστης.⁹

5. Zinc: Χωρίς περιορισμούς τράπεζα δεδομένων εμπορικώς διαθέσιμων ενώσεων για εικονική σάρωση (virtual screening)^{13,14}

Μία από τις μεγαλύτερες δυσκολίες της διαδικασίας της εφαρμογής της εικονικής σάρωσης είναι η έλλειψη κατάλληλης τράπεζας δεδομένων μικρών μορίων για χρήση. Υπάρχουν τράπεζες δεδομένων που η πρόσβαση σε αυτές απαιτεί χρηματική συμβολή και άλλες οι οποίες περιέχουν ενώσεις μη κατάλληλα δομημένες (π.χ. λείπει η γνώση απόλυτης απεικόνισης των χειρόμορφων κέντρων).

Για να είναι, επίσης, χρήσιμη μια συλλογή ενώσεων, θα πρέπει να υπάρχει πληροφορία, εκτός από τη τρισδιάστατη δομή των ενώσεων που περιέχει, και για τον προμηθευτή. Επιπλέον, θα πρέπει να παρέχονται πληροφορίες για τη διαμορφωτική τους ευελιξία, να είναι γνωστές οι πολλαπλές καταστάσεις πρωτονίωσης τους (ταυτομερείς μορφές), η στερεοχημεία τους, οι ιδιότητες ισομερών θέσεως (regiochemical) και η απόλυτη απεικόνιση των χειρόμορφων κέντρων τους. Τέλος, είναι απαραίτητο η βάση δεδομένων να ενημερώνεται ταυτόχρονα με την ενημέρωση των καταλόγων των προμηθευτών.

Μερικές από τις βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιούνται, με αρκετά μειονεκτήματα όπως αυτά που προαναφέρθηκαν (έλλειψη διαμορφωτικών, στερεοχημικών και φυσικοχημικών δεδομένων) είναι οι εξής:

- Accelrys Available Chemicals Directory (ACD), (<http://accelrys.com/products/databases/sourcing/available-chemicals-directory.html>)
- Chem Navigator database (<http://www.chemnavigator.com>)
- Ligand Info database (<http://Ligand.info>)
- ChemBank project (<http://chembank.med.harvard.edu>)
- Chempider (<http://www.chemspider.com>)

Κριτήρια για τη δημιουργία της βάσης Zinc, όπως περιγράφονται στο άρθρο από τους δημιουργούς της, είναι τα εξής:

1. Οι ενώσεις, που περιέχονται στη βάση, να είναι εμπορικά διαθέσιμες ώστε να είναι δυνατό να αποτιμηθούν βιολογικά στην περίπτωση που μια δοκιμασία εικονικής σάρωσης παρουσιάσει δυνάμει προσδέματα ενός μακρομορίου. Για το λόγο αυτό, έχουν δημιουργηθεί οκτώ κατάλογοι (Πίνακας 2) που βασίζονται σε ιδιότητες όπως κόστος, χρόνος παράδοσης, ποσότητα που διατίθεται προς πώληση ώστε ο χρήστης να βρίσκει ακριβώς αυτό που τον ενδιαφέρει.

Πίνακας 2 : Κατάλογοι βάσης δεδομένων Zinc

Είδη ενώσεων	Απόδοση στα Ελληνικά
building blocks	δομικά τμήματα
screening compounds	ενώσεις σάρωσης
procurement agents	προμηθεύσιμες ενώσεις
make-on-demand	ενώσεις που παρασκευάζονται κατόπιν απαίτησης
natural product	φυσικά προϊόντα
collabocules	ενώσεις προερχόμενες από συνεργαζόμενες πηγές
annotated	προσαρτημένες ενώσεις
boutique	ενώσεις νεωτερισμού

2. Υποσύνολα ενώσεων με μεταβλητές ιδιότητες όπως λειτουργικές ομάδες, μοριακό βάρος, και υπολογισμένο logP, να παρουσιάζουν ευκολία στη δημιουργία και διαχείρισή τους στη βάση.
3. Η βάση δεδομένων πρέπει να παρέχει πληροφορίες για πολλαπλές καταστάσεις πρωτονίωσης, ταυτομερείς μορφές, στερεοχημεία, προμηθευτές, και δυνατότητα ύπαρξης των απαραίτητων 3D διαμορφώσεων για τη διαδικασία της εικονικής σάρωσης. Οι τρισδιάστατες απεικονίσεις των μορίων θα πρέπει να είναι αυτές που πιθανότατα να εμφανίζονταν σε κάποιο σύμπλεγμα μακρομορίου-προσδέματος.
4. Θα πρέπει να είναι εύκολο να γίνεται προσθήκη νέων μορίων, να υπάρχει ένα είδος ταυτότητας των ενώσεων για να γίνεται ευκολότερος ο εντο-

πισμός αυτών και των πληροφοριών που τις συνοδεύουν, να είναι εύκολη η αφαίρεση των ενώσεων που δεν είναι πλέον διαθέσιμες, και η διόρθωση αυτών που παρουσιάζουν λάθη, για παράδειγμα στις νέες ενώσεις που προστίθενται να υπάρχει δυνατότητα δημιουργίας του συνόλου των δυνατών καταστάσεων πρωτονίωσης.

5. Τέλος, η βάση θα πρέπει να είναι εύχρηστη στη διαχείρισή της, δηλαδή να παρέχει χρήσιμα υποσύνολα ενώσεων, να είναι εύκολη η αναζήτηση των ενώσεων, να είναι έτοιμη προς χρήση χωρίς να απαιτείται καμιά επιπλέον διαδικασία προετοιμασίας των μορίων, και θα πρέπει να ανανεώνεται τακτικά.

5.1 Μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία της βάσης :

5.1.1 Πηγές ενώσεων και φίλτρα επιλογής αυτών :

Στη βάση δεδομένων Zinc χρησιμοποιούνται 134 κατάλογοι προμηθευτών και συμπεριλαμβάνονται και ενώσεις που έχουν αναφερθεί σε περισσότερες από είκοσι άλλες βάσεις ενώσεων (π.χ. Drugbank, ChEMBL, PubChem). Στην τελευταία αυτή περίπτωση, η Zinc παρέχει ολόκληρη την αντίστοιχη βάση ενώσεων και ένα υποσύνολο αυτής με ενώσεις που πιθανότατα να είναι εμπορικά διαθέσιμες. Η επιλογή των ενώσεων που μπορεί να βρει κάποιος χρήστης στη Zinc γίνεται με βάση τα εξής κριτήρια:

- το μοριακό βάρος(<700),
- logP (-4 <logP< 6),
- δότες δεσμών υδρογόνου (<6)
- δέκτες δεσμών υδρογόνου (<11)
- αριθμός περιστρεφόμενων δεσμών (<15).

Στη βάση δεδομένων δεν προστέθηκαν ενώσεις που περιλαμβάνουν άτομα πέρα των H,C,N,O,F,S,P,Si,Cl,Br,I με ελάχιστες εξαιρέσεις.

Χρησιμοποιείται, επίσης, φίλτρο για να αφαιρεθούν ανεπιθύμητες ενώσεις, οι οποίες θεωρούνται μη κατάλληλες από τους δημιουργούς της Zinc για τη διαδικασία της εικονικής σάρωσης. Για παράδειγμα, αφαιρούνται τα αλκυλαλογονίδια που θεωρούνται πολύ δραστικές ενώσεις ή μόρια που περιέχουν μέταλλα ή βόριο γιατί δεν υφίστανται παράμετροι για αυτά τα άτομα στο πεδίο δυνάμεων MMFF94.¹⁵ Στο διαδικτυακό χώρο <http://blaster.docking.org/filtering> παρέχονται πληροφορίες για τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται για το αρχικό φιλτράρισμα των ενώσεων που θα συμπεριληφθούν στην βάση δεδομένων Zinc. Κάθε χρήστης της Zinc μπορεί να επιλέξει ενώσεις από τα υποσύνολα που καλούνται “πρότυπες” (standard) στα οποία δεν περιέχονται μόρια πολύ

δραστικά και προβληματικά και υπάρχει, επίσης, η δυνατότητα επιλογής των υποσυνόλων που καλούνται “επιθυμητά” (clean) τα οποία περιέχουν μόρια με πρόσφορες λειτουργικές ομάδες (benign).

5.2. Προετοιμασία μορίων - Πρωτόκολλο :

Πραγματοποιείται μετατροπή των 2D SDF αρχείων των προμηθευτών σε SMILES με την χρησιμοποίηση του λογισμικού OpenEye's OEChem. Τυπικά, το 70% των μορίων είναι αχειρόμορφα και δεν εμφανίζουν δομική ασάφεια. Για τα υπόλοιπα οι πληροφορίες που παρέχονται από τους προμηθευτές είναι ασαφείς. Το γεγονός ότι οι περισσότερες εμφανίζουν ένα ή δύο χειρόμορφα κέντρα δομικής ασάφειας καθιστά τη δημιουργία δύο και τεσσάρων στερεοϊσομερών. Παρέχεται η δυνατότητα στον χρήστη να χρησιμοποιήσει μία απεικόνιση του μορίου για γρηγορότερη σάρωση ή τη χρησιμοποίηση υποομάδων της βάσης που δεν εμφανίζουν δομικές ασάφειες.

Για να εξασφαλιστεί η μοναδικότητα στη βάση, δημιουργείται μια “δοκιμαστική” (trial) τρισδιάστατη δομή με το λογισμικό Corina¹⁶ για κάθε ένωση που θα περιληφθεί στη Zinc ώστε να της δοθεί ένας μοναδικός αριθμός “ταυτότητας” που θα τη χαρακτηρίζει. Στη συνέχεια, η δοκιμαστική αυτή δομή μελετάται σε 4 περιοχές pH χρησιμοποιώντας την εφαρμογή Schrodinger's Epik version 2.1209 (περιλαμβάνονται για παράδειγμα οι αποπρωτονιώσεις καρβοξυλικών οξέων και τετραζολών και οι πρωτονιώσεις των περισσότερων αλειφατικών αμινών). Οι τέσσερις περιοχές pH είναι οι: α. pH = 7,05, β. pH = 6-8, γ. pH = 7-9,5, δ. pH = 4,5-6. Οι περιοχές αυτές εξασφαλίζουν την ορθή σε κάθε περιοχή pH ταυτομερή μορφή. Οι περισσότερες πρωτεΐνες απαιτούν τρισδιάστατες ταυτομερείς μορφές προσδετών που να είναι συμβατές με περιοχές pH τιμών (6-8) αφού οι φυσιολογικές λειτουργίες των πρωτεϊνών αυτών παρατηρούνται στις «εν λόγω» τιμές pH. Υπάρχουν και παραδείγματα όπως οι περιοχές πρόσδεσης των μεταλλοενζύμων που απαιτούν διαμορφώσεις συμβατές με υψηλότερες τιμές pH (8-9). Τέτοιο παράδειγμα, αποτελεί τα αποπρωτονιωμένα σουλφοναμίδια. Ακολουθεί η εφαρμογή του λογισμικού OpenEye's Omega για τη δημιουργία 3D μοντέλων. Με τη χρήση του λογισμικού AMSOL¹⁷ υπολογίζονται τα μερικά ατομικά φορτία, τα οποία θεωρούνται σημαντικοί ηλεκτροστατικοί παράγοντες, για τη διαμόρφωση κάθε κατάστασης πρωτονίωσης, στερεοϊσομερούς, και ταυτομερούς.

Για τα μόρια που περιέχονται στη βάση Zinc δίνονται πληροφορίες για τις μοριακές ιδιότητές

τους. Αυτές περιλαμβάνουν το μοριακό βάρος, τον αριθμό των περιστρεφόμενων δεσμών, το logP, τον αριθμό των δοτών δεσμών υδρογόνου, τον αριθμό των δεκτών δεσμών υδρογόνου, υπολογιζόμενα από το λογισμικό Molinspiration's mib. Δίνονται, επίσης, πληροφορίες για τον αριθμό των χειρόμορφων κέντρων, τον αριθμό των διπλών δεσμών (E/Z ισομερή) και τον αριθμό των άκαμπτων τμημάτων. Για τις πολικές και άπολες ενέργειες αποδιαλύτωσης (desolvation) χρησιμοποιείται το λογισμικό AMSOL (πρωτόκολλο Wei).

Ειδικά, για τον υπολογισμό logP για κάθε ένωση που αποθηκεύεται στην Zinc, χρησιμοποιείται η εφαρμογή που παρέχεται από την Molinspiration, και συμφωνεί με τις πειραματικά υπολογισμένες logP για μεγάλη ποικιλία ενώσεων. Η εφαρμογή αυτή στηρίζεται στον αλγόριθμο XLogP (Wang).¹⁸

Για κάθε μόριο, επίσης, δίνονται πληροφορίες για τον προμηθευτή και τον αριθμό καταλόγου για κάθε εμπορική πηγή της ένωσης. Επίσης, όποτε αυτό είναι δυνατόν παρέχονται πληροφορίες για τη βιολογική δραστηριότητα και λειτουργικότητα των ενώσεων.

5.3 Δομή της Zinc :

Η βάση δεδομένων σχεδιάστηκε με τρόπο ώστε να επιτυγχάνεται εύκολα η προσθήκη μιας νέας ένωσης, να υπάρχουν υποομάδες ενώσεων με βάση τις ιδιότητες που προαναφέρθηκαν και να μπορεί ο χρήστης να δημιουργήσει το ερωτηματολόγιό του ώστε να εντοπίσει την ομάδα ενώσεων που τον ενδιαφέρει. Επίσης, έχει προβλεφθεί η εύκολη πρόσβαση στην βάση (download). Για αυτό το λόγο οι διάφορες υποκατηγορίες ενώσεων παρέχονται σε συμπιεσμένους φακέλους που παραλαμβάνονται μέσω του διαδικτύου με γρήγορους ρυθμούς (ready-to-download compressed files).

Η διαδικτυακή τοποθεσία της βάσης δεδομένων βρίσκεται στη διεύθυνση <http://zinc.docking.org> και περιλαμβάνει πάνω από 20 εκατομμύρια εμπορικά διαθέσιμα μόρια σε διαμορφώσεις που απαντώνται σε βιολογικά συστήματα. Οι ενώσεις κατηγοριοποιούνται και σε άλλες κατηγορίες εκτός των “πρότυπων” και “επιθυμητών” που προαναφέρθηκαν. Για παράδειγμα υπάρχει το υποσύνολο υπό τον τίτλο «ενώσεις που προσομοιάζουν τις οδηγούς» (lead-like) οι οποίες έχουν εύρος μοριακών βαρών 150 - 350, logP < 4, αριθμό δοτών δεσμών υδρογόνου = 3, αριθμό δεκτών δεσμών υδρογόνου = 6 και το υποσύνολο «δομικά τμήματα που προσομοιάζουν αυτά που μπορούν να προσδώσουν βιολογικές ιδιότητες» (fragment-like) τα οποία έχουν τιμές -2

<logP< 3, λιγότερους από τρεις δότες δεσμών υδρογόνου, λιγότερους από 6 δέκτες δεσμών υδρογόνου, λιγότερους από τρεις περιστρεφόμενους δεσμούς και μοριακό βάρος μικρότερο από 250. Εμφανίζονται και άλλα υποσύνολα ενώσεων, όπως για παράδειγμα το υποσύνολο υπό τον τίτλο “φυσικά προϊόντα” ή το υποσύνολο “μεταβολίτες”.

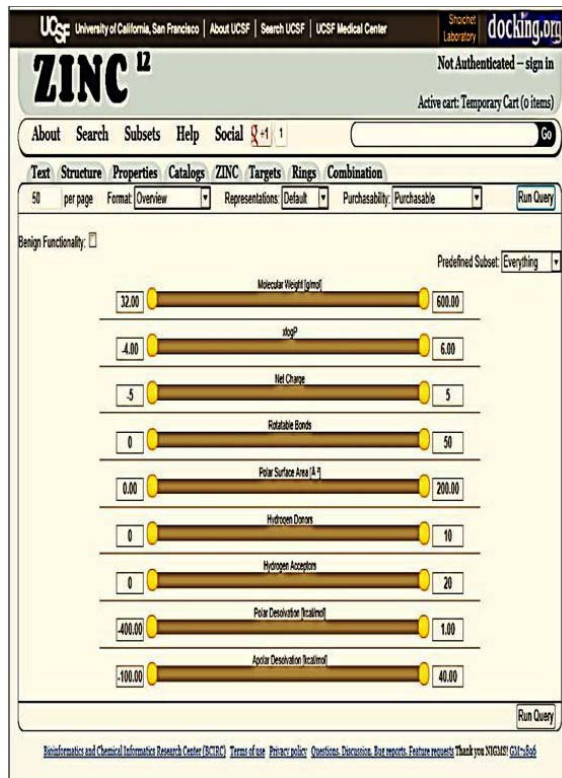
Αξίζει, εδώ να αναφερθεί ότι στη Zinc περιλαμβάνονται ενώσεις που παραβιάζουν τον κανόνα του Lipinski εξαιτίας υψηλών τιμών logP. Αυτό συμβαίνει λόγω της αβεβαιότητας των υπολογιζόμενων αυτών τιμών.

Οι ενώσεις της βάσης παρέχονται στους χρήστες σε αρχεία SMILES, mol2, SDF, DOCK flexible.

5.4 Αναζήτηση στην ZINC :

Οι χρήστες έχουν τη δυνατότητα αναζήτησης κάνοντας χρήση διαφόρων κριτηρίων, όπως για παράδειγμα αυτό της δόμησης της συγκεκριμένης προς μελέτη ένωσης. Άλλα κριτήρια μπορούν να είναι η βιολογική δραστηριότητα, οι φυσικές ιδιότητες, ο προμηθευτής, το όνομα μιας ένωσης ακόμα και το μακρομόριο στόχος μιας ερευνητικής προσπάθειας.

Στο Σχήμα 5 που παριστά το διαδικτυακό χώρο της τράπεζας δεδομένων Zinc¹⁵ αναγράφονται οι τρόποι που μπορεί να χρησιμοποιήσει ένας χρήστης προ-



Σχήμα 5: Διαδικτυακός χώρος : <http://zinc.docking.org>.

κειμένου να αναζητήσει τις επιθυμητές για εκείνον ενώσεις δεδομένων αναλόγως του ερευνητικού του στόχου.

Οι τρόποι αυτοί είναι: (α) Μέσω λέξεων-κλειδιών στην στήλη Text (κείμενο). (β) Σχεδιάζοντας την επιθυμητή δομή στην στήλη Structure (δομή). (γ) Μέσω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων (Properties). Παρέχεται η δυνατότητα στο χρήστη να ορίσει το εύρος των τιμών που επιθυμεί να έχουν οι φυσικές ιδιότητες που παρουσιάζονται στο Σχήμα 5 και Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Απόδοση όρων Σχήματος 5 στα Ελληνικά

Φυσικές ιδιότητες	Απόδοση στα ελληνικά
Molecular Weight [g/mol]	Μοριακό Βάρος
xlogP	-
Net Charge	Ολικό φορτίο
Rotatable Bonds	Περιστρεφόμενοι δεσμοί
Polar Surface Area	Πολική επιφάνεια
Hydrogen Donors	Δότες δεσμών υδρογόνου
Hydrogen Acceptors	Δέκτες δεσμών υδρογόνου
Polar Desolvation [kcal/mol]	Πολική αποδιαλύτωση
Apolar Desolvation [kcal/mol]	Απολη αποδιαλύτωση

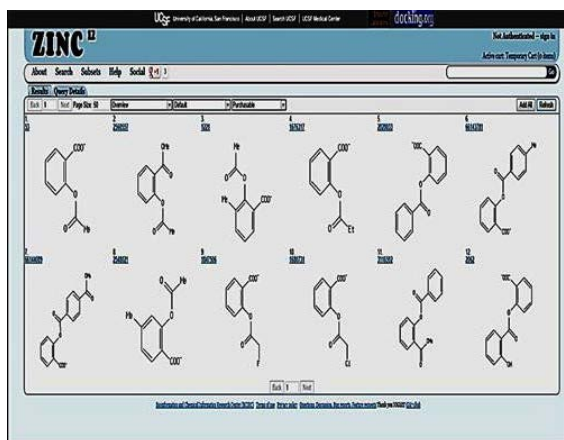
(δ) Με βάση τους καταλόγους στη στήλη Catalogs και την ταυτότητα που έχει λάβει μια ένωση που συμπεριλαμβάνεται στην Zinc. (ε) Ανάλογα του επιθυμητού βιολογικού στόχου (στήλη Targets). (στ) Στη στήλη Rings αναζητούνται ενώσεις που περιέχουν τον δακτύλιο που ο χρήστης θα ορίσει π.χ. σκελετό ανθρακενίου. (η) Τέλος, στη στήλη Combination υπάρχει ένας σύνθετος τύπος ερωτηματολογίου που περιλαμβάνει όλα τα προηγούμενα κριτήρια αναζήτησης. Στο Σχήμα 6 που ακολουθεί παρουσιάζεται ένα σύνθετο ερωτηματολόγιο όπου διακρίνονται τα επιμέρους κριτήρια αναζήτησης όπως οι φυσικές ιδιότητες, η δυνατότητα σχεδίασης δομών, η δυνατότητα επιλογής καταλόγων καθώς και τα υπόλοιπα κριτήρια αναζήτησης που μπορεί ένας χρήστης να χρησιμοποιήσει στην τράπεζα δεδομένων Zinc.

Τα αποτελέσματα της αναζήτησης μπορεί ο χρή-

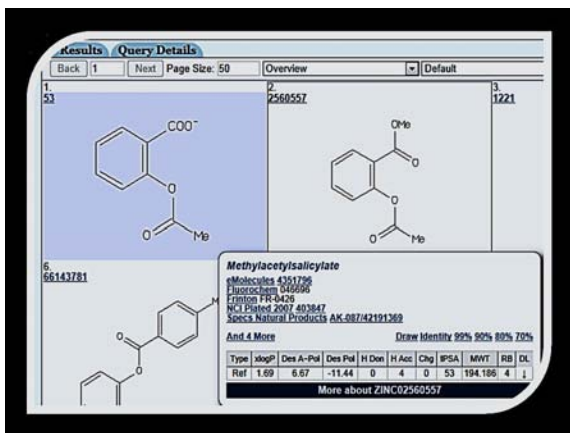
Σχήμα 6: Ερωτηματολόγιο σύνθετης αναζήτησης, διαδικτυακός χώρος : <http://zinc.docking.org>.

στης να τα επιθεωρήσει είτε σε πολύ λίγο χρόνο ή περιμένοντας περισσότερο αν δόθηκαν περισσότερα περίπλοκα ερωτηματολόγια. Στο Σχήμα 7 φαίνονται τα αποτελέσματα της αναζήτησης, σχεδιάζοντας π.χ. τον τύπο της ασπιρίνης και ζητώντας να βρεθούν επιπλέον και οι δομές που ομοιάζουν κατά 90% με τον τύπο που σχεδιάστηκε. Με αυτόν τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα στον χρήστη να δημιουργήσει τα υποσύνολα ενώσεων που επιθυμεί για μετέπειτα χρήση.

Όπως παρατηρείται στο Σχήμα 7, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αναζήτησης με τον κωδικό με



Σχήμα 7: Αποτελέσματα αναζήτησης της ασπιρίνης και παρεμφερών δομών στη βάση δεδομένων Zinc.(Διαδικτυακός χώρος: <http://zinc.docking.org>).



Σχήμα 8: Με ανακύληση του ποντικιού στη δομή με αριθμό ταυτότητας Zinc 02560557 παρέχονται επιπλέον πληροφορίες για τη συγκεκριμένη ένωση.

τον οποίο καταχωρήθηκε το κάθε μόριο στη βάση, συνοδευόμενο από τη δισδιάστατη δομή του. Με ανακύληση του ποντικιού σε κάθε δομή παρέχονται επιπλέον πληροφορίες, όπως φαίνεται στο Σχήμα 8.

Παρακάτω παρατίθεται ένα παράδειγμα για το πως μπορεί ένας χρήστης να χρησιμοποιήσει τη βάση δεδομένων Zinc προκειμένου να διευκολυνθεί στη διαδικασία της εικονικής σάρωσης.

Πρόβλημα: Χρήστης επιθυμεί να ανακαλύψει προσδέματα (ligands) δυνάμει καινοτόμα **υποψηφία φάρμακα** για μια πρωτεΐνη-στόχο. Απαιτείται, λοιπόν, μια βιβλιοθήκη εμπορικά διαθέσιμων ενώσεων της κατηγορίας “lead-like”. Τα βήματα που πρέπει να ακολουθήσει για να πραγματοποιήσει την διαδικασία της εικονικής σάρωσης με σκοπό την ανακάλυψη νέων ενώσεων-οδηγών περιγράφονται στη συνέχεια:

A) Από τον κατάλογο Subsets χρησιμοποιείται η επιλογή Properties. B) Στον οριζόντιο άξονα επιλέγει τη στήλη lead-like. Γ) Στον κάθετο άξονα επιλέγει την γραμμή Standard. Δ) Επιλέγεται ο τίτλος lead-like στην πάνω αριστερά γωνία του πίνακα όπου διασταυρώνονται οι επιλογές των περιπτώσεων (B) & (Γ). E) Ο χρήστης επιλέγει πως θα αποθηκεύσει τη βιβλιοθήκη του υποσυνόλου lead-like για να τη χρησιμοποιήσει στη διαδικασία της εικονικής σάρωσης. Παρέχονται οι δυνατότητες της αποθήκευσης σε SDF ή MOL2 ή flexibase ή SMILES αρχεία. Επιλέγεται η καρτέλα Downloads αμέσως μετά το κύριο μενού εντολών της ιστοσελίδας της Zinc όταν ο χρήστης επιθυμεί οι ενώσεις που θα χρησιμοποιήσει στη διαδικασία της εικονικής σάρωσης να είναι συμβατές με συγκεκριμένες περιοχές pH.

Στο άρθρο των John.J.Irwin και συνεργατών¹⁴ παρατίθενται και άλλα χρήσιμα παραδείγματα για τη χρήση της Zinc.

5.5 Διαδικτυακός χώρος:

<http://www.molinspiration.com>

Στο διαδικτυακό αυτό χώρο, ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να υπολογίσει σημαντικές μοριακές ιδιότητες μιας ένωσης, όπως για παράδειγμα τον αριθμό των δοτών δεσμών υδρογόνου, καθώς και την πιθανότητα βιοδραστικότητας της ένωσης σε μακρομόρια που αποτελούν τους σημαντικότερους στόχους φαρμάκων.

5.6 Υπολογισμός μοριακών ιδιοτήτων

logP: Συντελεστής μερισμού στο σύστημα οκτανόλης νερού. Χρησιμοποιείται σε μελέτες QSAR (Ποσοτικές σχέσεις δομής δράσης) και στον ορθολογικό σχεδιασμό φαρμάκων ως κριτήριο της λιποφιλίας του μορίου. Η λιποφιλία επηρεάζει την απορρόφηση των φαρμάκων από τον οργανισμό, την βιοδιαθεσιμότητα, τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις φαρμάκου-υποδοχέα, το μεταβολισμό και την τοξικότητά τους. Υπάρχουν πολλά συστήματα υπολογισμού της παραμετρου logP.¹⁹ **MiLogP:** Μέθοδος που χρησιμοποιείται στο διαδικτυακό χώρο <http://www.molinspiration.com/> για τον υπολογισμό του logP. Για το 50,5% των μορίων που έχει υπολογιστεί το logP με τη μέθοδο miLogP και έχει συγκριθεί με την πειραματικά υπολογιζόμενη τιμή logP έχει βρεθεί σφάλμα < 0,25, στο 80,2% σφάλμα < 0,5, και στο 96,5% σφάλμα < 1,0. Μόνο στο 3,5% των μορίων παρατηρήθηκε σφάλμα μεγαλύτερο από 1,0.

Μοριακή Πολική Επιφάνεια (Molecular Polar Surface Area TPSA): Θεωρείται κριτήριο απορρόφησης ενός φαρμάκου με αντιστρόφως ανάλογη σχέση. Σχετίζεται με την ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου.²⁰

Κανόνας Lipinski ή “κανόνας των 5”:²¹ Σύμφωνα με αυτό τον κανόνα, τα μόρια που είναι περισσότερο πιθανό να είναι έχουν κατάλληλες βιοφάρμακευτικές ιδιότητες είναι αυτά που έχουν logP = 5, μοριακό βάρος = 500, δέκτες δεσμών υδρογόνου = 10, δότες δεσμών υδρογόνου = 5. Μόρια που παραβιάζουν δυο ή περισσότερα κριτήρια του κανόνα αυτού πιθανόν να παρουσιάζουν πρόβλημα βιοδιαθεσιμότητας κατά την χορήγηση από το στόμα.

Αριθμός περιστρεφόμενων δεσμών (Number of Rotatable Bonds–nrotb): Κριτήριο της μοριακής ευελιξίας.

Μοριακός όγκος (Molecular volume): Η ιδιότητα αυτή αποτελεί ένα από τα φαρμακοχημικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν τόσο τη διαπερατότητα όσο και την προσδεση στον υποδοχέα, σχετιζόμενο με το μέγεθος και την ευκαμψία της κοιλότητας του ενεργού κέντρου.²²

5.7 Υπολογισμός πιθανότητας βιοδραστικότητας

Η φαρμακομοριακή ομοιότητα (druglikeness) μπορεί να οριστεί ως μια περίπλοκη ισορροπία διαφόρων μοριακών ιδιοτήτων και χαρακτηριστικών στη δομή ενός μορίου, τα οποία οδηγούν στο συμπέρασμα αν μια συγκεκριμένη ουσία προσομοιάζει με κάποιο γνωστό φάρμακο. Αυτές οι ιδιότητες, κυρίως η λιποφιλία, η ηλεκτρονική διασπορά, το μέγεθος του μορίου, η ευελιξία του, τα χαρακτηριστικά που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε δεσμούς υδρογόνου, όλα αυτά μαζί με άλλα φαρμακομοριακά χαρακτηριστικά επηρεάζουν την συμπεριφορά ενός μορίου σε ένα ζωντανό οργανισμό συμπεριλαμβανομένης της βιοδιαθεσιμότητας, της μεταφοράς του μορίου, της τοξικότητας, και της μεταβολικής σταθερότητας (metabolic stability).

Η ποικιλία των φαρμακευτικών στόχων (καθένας από τους οποίους απαιτεί ένα διαφορετικό συνδυασμό μοριακών χαρακτηριστικών) είναι τόσο μεγάλη που είναι πιθανό να βρεθεί ένας κοινός παρανομαστής «βάσει» του οποίου να εκφραστεί η ομοιότητα ενός μορίου με ένα φάρμακο όπως για παράδειγμα οι κανόνες του Lipinski. Παρόλα αυτά ποσοτικά κριτήρια όπως το να τίθενται όρια στο μοριακό βάρος, στο logP, στον αριθμό των δοτών ή

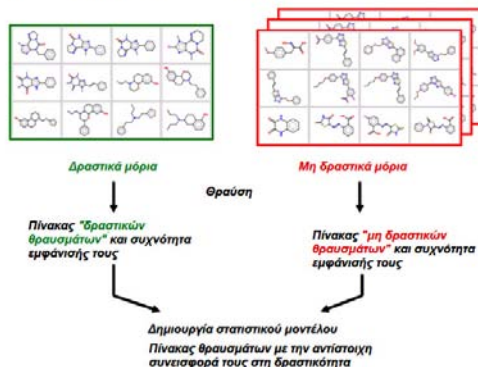
δεκτών υδρογόνου απλά βοηθούν στην εύκολη διάκριση ενώσεων που δε θα μπορούσαν ποτέ να είναι βιολογικά δραστικές.²¹

Στη Molinspiration θεωρείται ότι πρέπει να δοθεί έμφαση στις διάφορες κατηγορίες μακρομορίων-φαρμακευτικών στόχων και να αποδοθεί σε αυτές ένα σκόρ δραστικότητας μορίων. Στη μέθοδο που ακολουθείται χρησιμοποιείται Bayesian στατιστική ανάλυση. Συγκεκριμένα, συγκρίνονται δομές δραστικά ενεργών ενώσεων ως προς ένα μακρομόριο-στόχο με δομές μη ενεργών ενώσεων για να διακριθούν ποια δομικά χαρακτηριστικά (τα οποία με την σειρά τους αποδίδουν συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες) είναι αυτά που συναντώνται στα ενεργώς δραστικά μόρια. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται οι προβλεπόμενες τιμές φαρμακομοριακών ιδιοτήτων και βιοδραστικότητας για την ασπρίνη

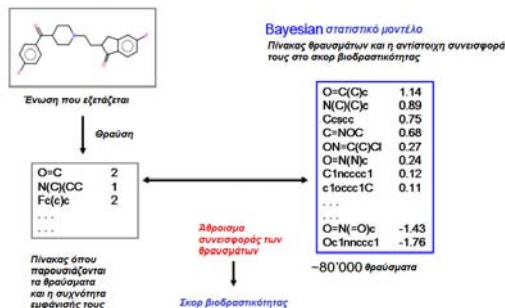
Πίνακας 4: Υπολογισμός μοριακών ιδιοτήτων και πιθανότητα βιοδραστικότητας της ασπρίνης

Ιδιότητα	Προβλεπόμενη τιμή
miLogP	1,434
TPSA	63,604
natoms	13,0
MW	180,159
nON	4
nOHNH	1
nviolations	0
nrotb	3
volume	155,574
Στόχοι φαρμάκων	Σκορ
Προσδέματα GPCR (GPCR ligand)	-0,76
Ρυθμιστής πρωτεϊνών-καναλιών ιόντων (Ion channel modulator)	-0,32
Αναστολέας κινάσης (Kinase inhibitor)	-1,06
Προσδέτης πυρηνικών πρωτεϊνών (Nuclear receptor ligand)	-0,44
Αναστολέας ενζύμων (Enzyme inhibitor)	-0,28
Αναστολέας πρωτεασών (Protease inhibitor)	-0,82

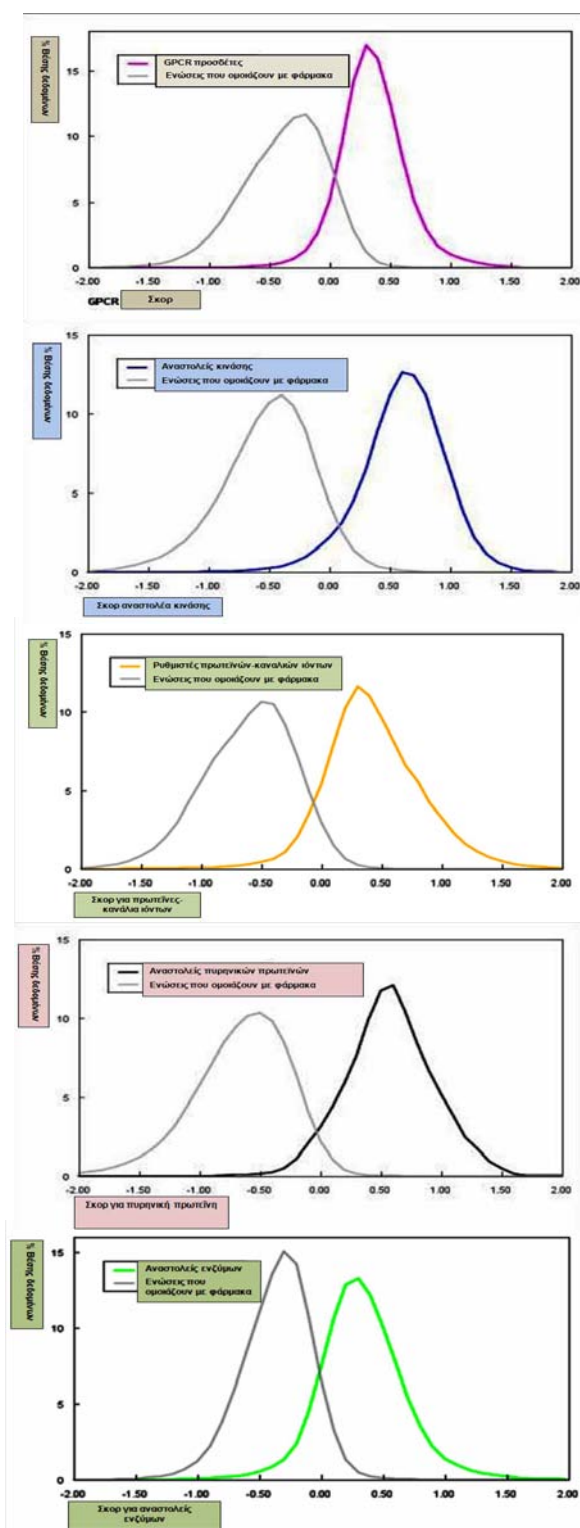
Βήμα 1. Δημιουργία στατιστικού μοντέλου για τη βιοδραστικότητα (Bayesia)



Βήμα 2. Υπολογισμός σκορ βιοδραστικότητας



Σχήμα 9: Βήματα που εκτελούνται ώστε να προκύψει το σκορ βιοδραστικότητας.[24]



Σχήμα 10: Γραφήματα από το διαδικτυακό τόπο [23] που δείχνουν το διαχωρισμό μεταξύ ενώσεων με χαρακτηριστικά φαρμάκου (druglike) και ενεργών βιολογικά μορίων για τις συγκεκριμένες κατηγορίες μακρομορίων-φαρμακευτικών στόχων που περιγράφονται.

5.8 Αξιολόγηση των μορίων

Η αξιολόγηση των μορίων δείχνεται στο Σχήμα 9 και ακολουθεί τα πιο κάτω βήματα.

Το 1^ο βήμα στη διαδικασία περιλαμβάνει την ανάλυση δραστικών ενώσεων ως προς ένα βιολογικό στόχο (ενώσεις εκγύμνασης) και σύγκριση αυτών με μη δραστικές ενώσεις. Με βάση αυτή την ανάλυση, δημιουργείται ένα μοντέλο διαφόρων θραυσμάτων (στατιστικό μοντέλο), των οποίων η συνεισφορά στη δραστικότητα βαθμολογείται ανάλογα.

Το 2^ο βήμα περιλαμβάνει ανάλυσή της υπό μελέτη ένωσης και υπολογισμό της συνεισφοράς καθενός «δραστικού δομικού τμήματος» της. Έτσι, προκύπτει το σκορ βιοδραστικότητας, το οποίο αποτελεί μια ένδειξη για την πιθανή βιοδραστικότητα ως προς ένα βιολογικό στόχο.

Στις παρακάτω εικόνες του Σχήματος 10 φαίνεται η διασπορά των τιμών δραστικότητας, για τις έξι κυριότερες κατηγορίες φαρμακευτικών στόχων, των γνωστών δραστικά ενεργών μορίων (διάφορα χρώματα) κάθε κατηγορίας καθώς και οι τιμές των ουσιών που ομοιάζουν με φάρμακα της συγκεκριμένης κατηγορίας (γκρι χρώμα). Όσο υψηλότερο είναι το σκορ για μια ένωση που μελετάται τόσο μεγαλύτερη πιθανότητα υπάρχει να είναι ενεργό το συγκεκριμένο μόριο.

Παρακάτω, δίδονται τα κριτήρια αξιολόγησης δραστικών και ενώσεων που ομοιάζουν με φάρμακα για κάθε κατηγορία μακρομορίων στόχων σε μορφή γραφήματος (Σχήμα 10) όπως αυτά καταγράφονται στο διαδικτυακό χώρο.²³⁻²⁴

Βιβλιογραφία

1. Ehrlich P. *Dtsch. Chem. Ges.* 42, 17–47, 1909
2. Langer T., Hoffmann R.D. (2006) *Pharmacophores and Pharmacophore Searches*. John Wiley & Sons.
3. Cramer R. D. III, Patterson D. E., Bunce, J. D. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 5959–67, 1988.
4. Klebe G. Comparative Molecular Similarity Indices Analysis: CoMSIA. *Perspect. Drug Discov. Des.* 12, 87–104, 1998.
5. Finch H. The conformational musings of a medicinal chemist *Drug Discov. Today*. [Epub ahead of print] 2013.
6. Yang S.-Y. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances, *Drug Disc. Today*, 15, 444–450, 2010.

Rational Approach for the discovery of Lead-compounds using Pharmacophore Models. The Use of Drug Databank Zinc in Virtual Screening.

Eleni Koulouridi¹, Thierry Langer², Sharon D. Bryant²
and Thomas Mavromoustakos¹

¹ Laboratory of Organic Chemistry,
Chemistry Department,
University of Athens, Panepistimioupoli,
157 71, Zografou, Athens

² Inte:Ligand Softwareentwicklungs und Consulting
GmbH Mariahilferstrasse 74B/11 Vienna 1070, Austria

Summary:

In this review article, the role of the pharmacophore model in the discovering of novel drugs is described. The methodologies used to create a pharmacophore model are classified as: 1) ligand-based and 2) structure -based. The difficulties encountered in the application of both methodologies are also described. An example is given for the use of a pharmacophore model in the process of virtual screening and hints to avoid running into problems. The LigandScout, a software created by Inte:Ligand, is used to create pharmacophore models. The drug data-base Zinc and its application Molinspiration for calculation of molecular properties and the likelihood of bioactivity are extensively described.

Keywords: rational drug design, pharmacophore model, LigandScout, Zinc, Molinspiration.

7. Gregori - Puigjané E. , Setola V. , Hert J., Crews B. A., Irwin J. J., Lounkine E. , Marnett L., Roth B. L., Shoichet B. K. Identifying mechanism-of-action targets for drugs and probes, *PNAS*, 109, 11178-11183, 2012.
8. Böhm H-J. A novel computational tool for automated structure-based drug design. *J. Mol. Recognit.*, 6, 131–137, 1993.
9. Διαδικτυακός χώρος: <http://www.inteligand.com>, On-line Manual.
10. Boehm H.-J., Boehringer M., Bur D., Gmuender H., Huber W., Klaus W., Kostrewa D., Kuehne H., Luebbers T., Meunier-Keller N., Mueller F. Novel inhibitors of DNA Gyrase: 3D Structure Based Biased Needle Screening, Hit Validation by Biophysical Methods, and 3D Guided Optimization. A Promising Alternative to Random Screening, *J. Med. Chem.* 43, 2664-2674, 2000.
11. Hsieh J.H., Wang X.S., Teotico D., Golbraikh A., Tropsha A. Differentiation of AmpC beta-lactamase binders vs. decoys using classification kNN QSAR modeling and application of the QSAR classifier to virtual screening, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 22, 593-609, 2008.
12. Walters W.P., Stahl M.T., Murcko M.A. Virtual screening – an overview *Drug Discov. Today* 3, 160-178, 1998
13. Irwin J., Shoichet B. ZINC - A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model.* 45, 177-182, 2005.
14. Irwin J.J., Sterling T., Mysinger M.M., Bolstad E.S., Coleman R.G. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *J. Chem. Inf. Model.* 52, 1757–1768, 2012.
15. Διαδικτυακός χώρος: http://wiki.uoft.bkslab.org/index.php/ZINC_Database.
16. Διαδικτυακός χώρος: <http://www.molecular-networks.com/products/corina>
17. Διαδικτυακός χώρος: <http://www.ibridgenetwork.org/umn/amsol-7-1>
18. Wang R., Fu Y., Lai L. A New Atom-Additive Method for Calculating Partition Coefficients. *J.Chem.Inf.Comput.Sci.* 37,615-621,1997.
19. Mannhold R. (2006) Calculation of Lipophilicity: A classification of Methods, In: Testa B, Kramer S.D., Wunderli-Allenspach H., Folkers G. (Eds). Pharmacokinetic Profiling in Drug Research, Wiley, VCH, Zurich, pp 333-352.
20. Clark D. E. What has polar surface area ever done for drug discovery? *Fut.Med Chem.* 3,3469-84, 2011
21. Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 3-26, 2001
22. Nicholls A, McGaughey G.B., Sheridan R.P., Good A.C., Warren G., Mathieu M., Muchmore S.W., Brown S.P., Grant J.A., Haigh J.A., Nevins N., Jain A.N., Kelley B. Molecular shape and medicinal chemistry: a perspective. *J.Med. Chem.* 53,3862-86, 2010.
23. Διαδικτυακόςχώρος: <http://www.molinspiration.com/docu/miscreen/druglikeness.html>.
24. Διαδικτυακόςχώρος: <http://www.molinspiration.com/docu/miscreen/virtualsecreening.html>.

Φαρμακευτικά φυτά στην επούλωση τραυμάτων

Βουδούρη Δήμητρα, Τεσσερομμάτη Χριστίνα*

Εργαστήριο Πειραματικής Φαρμακολογίας Ιατρική Σχολή, Ε.Κ.Π.Α.,
Μικράς Ασίας 75, Γουδή 11527, Αθήνα

Περίληψη

Η επούλωση ενός τραύματος αποτελεί πολύπλοκη διεργασία. Παρασκευάσματα φυτικής προέλευσης εμφανίζουν θετικά αποτελέσματα, ανάλογα ή και θετικότερα των συνθετικών φαρμάκων. Μεταξύ των φυτών που διαθέτουν επουλωτικές ιδιότητες αποτελεσματικότητα επιδεικνύουν η καλέντουλα (άνθος), το υπερικό (βάλσαμο ή σπαθόχορτο) (ανθισμένα υπέργεια μέρη), η αλόη (γέλη) κ.ά., των οποίων η επουλωτική δράση έχει τεκμηριωθεί πέραν της παραδοσιακής χρήσης τους και από *in vitro* και *in vivo* μελέτες. Στην παρούσα ανασκόπηση γίνεται εκτεταμένη αναφορά στα δραστικά συστατικά, στις ιδιότητες και δράσεις των ανωτέρω φαρμακευτικών φυτών. Η συζήτηση εστιάζεται στη δυνατότητα χρησιμοποίησής τους στη διαδικασία της επούλωσης τραυμάτων αλλά και γενικότερα στη Θεραπευτική, καθώς και στις αλληλεπιδράσεις τους, η μελέτη των οποίων είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ανεύρεση του καταλληλότερου και δραστικότερου συνδυασμού στην εκάστοτε θεραπεία.

1. Εισαγωγή-Σύγχρονη Φυτοθεραπεία

Η χρήση των φυτών με σκοπό τη θεραπεία αποτελεί μία αρχαιότατη πρακτική. Οι φαρμακευτικές ιδιότητες των φυτών εντοπίστηκαν από τις αρχές του πολιτισμού μας και χρησιμοποιήθηκαν για την αντιμετώπιση του πόνου, την επούλωση τραυμάτων καθώς και τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών.¹

Τα φάρμακα φυτικής προέλευσης αποτελούν μια δραστική μονάδα από μίγμα πολλών χημικών ουσιών. Στη θεραπευτική μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτούσιο τμήμα ξηρού φυτού ή φυτικά παρασκευάσματα όπως: έγχυμα, αφέψημα, ελαιώδες εκχύλισμα, αλκοολικά εκχυλίσματα κ.λ.π.. Τα φάρμακα φυτικής προέλευσης διαθέτουν ευρύ φαρμακολογικό και θεραπευτικό πεδίο

δράσης, λόγω της χημικής σύστασης των φερόμενων ως δραστικών ουσιών αλλά και της συνεργικής τους δράσης με άλλα χημικά συστατικά.²

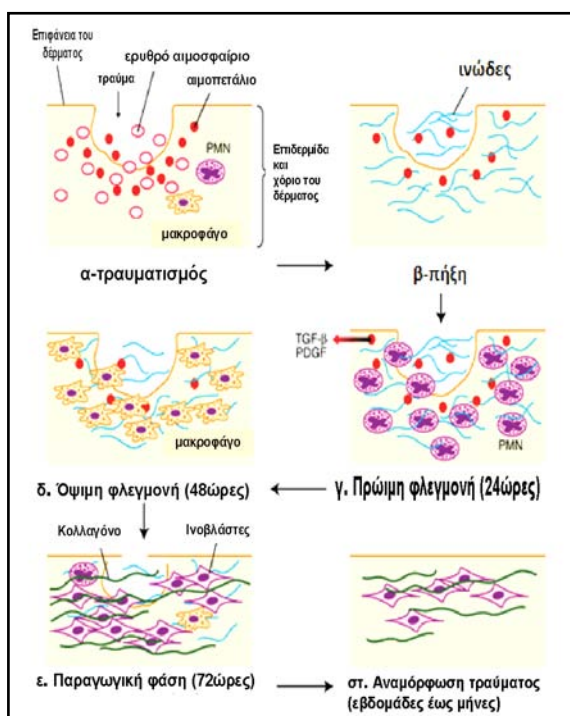
2. Η διεργασία της επούλωσης

Με τον όρο *επούλωση* εννοούμε το σύνολο των αντιδράσεων που αποσκοπούν στην αποκατάσταση της λύσης της ακεραιότητας των ιστών με στόχο τη διατήρηση της ακεραιότητας του οργανισμού.³ Η επούλωση αποτελεί πολύπλοκη διεργασία και διέπεται από βιολογικούς μηχανισμούς, όπως επιθηλιοποίηση, παραγωγή συνδετικού ιστού από τους ινοβλάστες και εναπόθεση και σχηματισμό πλέγματος κολλαγόνου, εισολκή με προς τα έσω επέκταση των χειλέων του τραύματος και ρίκνωση επιμήκων σωλήνων.³

Η διαδικασία της επούλωσης διακρίνεται σε τέσσερις φάσεις (Σχήμα 1)⁴:

I. Αιμόσταση και πήξη: Η βλάβη ιστού συνοδεύεται από απελευθέρωση πληθώρας παραγόντων από το κυτταρόπλασμα (πχ. θρομβοξάνης A_2 , προσταγλανδίνης PGE2- α , αυξητικών παραγόντων, όπως PDGF, TGF- β , EGF, κλπ). Σημειωτέον ότι τα αιμοπετάλια και οι ιστοί απελευθερώνουν θρομβοκινάση (μετατροπέα της προθρομβίνης σε θρομβίνη) με τελικό προϊόν το μονομερές ινώδες, το οποίο συμβάλλει στη δημιουργία του θρόμβου.⁵

II. Φλεγμονή: Αποτελεί εντοπισμένη απάντηση του οργανισμού στη λοίμωξη ή τη βλάβη ιστών (τραύμα/έγκαυμα). Τα φαγοκύτταρα, κύτταρα-κλειδί της φλεγμονής, συμβάλλουν στην πρόκληση αγγειοδιαστολής, ερυθρότητας και αύξησης της θερμοκρασίας, εξαγγείωση πλάσματος μέσω αύξησης της διαπερατότητας των τριχοειδών και των φλεβιδίων της φλεγμαινίσσας περιοχής και μεταφορά πρωτεϊνών από το πλάσμα στο μεσοκυττάριο υγρό.



Σχήμα 1. Φάσεις της επούλωσης τραύματος του δέρματος (προσαρμοσμένο από την παραπομπή⁴).

III. Παραγωγική φάση (σχηματισμός κοκκιώδους ιστού, παραγωγή κολλαγόνου και αγγειογένεση): Σημαντικό ρόλο παίζουν οι ινοβλάστες, που μεταναστεύουν στην τραυματισμένη περιοχή. Σχηματίζεται χαλαρός κοκκιώδης ιστός αποτελούμενος από ινική, ινωδονεκτίνη, κολλαγόνο, γλυκοζοαμινογλυκάνες και υαλουρονικό οξύ.³ Η διαδικασία της αγγειογένεσης διακόπτεται όταν αποκατασταθεί η οξυγόνωση του ιστού και απουσιάζουν υποξικά ερεθίσματα τοπικά καθώς και αυξημένη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος.

IV. Αναμόρφωση του τραύματος και δημιουργία ουλής: Παρατηρείται ανάπτυξη νέου επιθηλίου και τελική διαμόρφωση του ουλώδους ιστού και μπορεί να διαρκέσει μέχρι 1 - 2 χρόνια. Η σύνθεση του κολλαγόνου φτάνει τη μέγιστη τιμή εντός 5 έως 7 ημερών ακολουθούμενη από προοδευτική ελάττωση. Σχηματίζεται ώριμη ουλή με ελαστικότητα και ανθεκτικότητα εξασφαλίζοντας την ακεραιότητα του τραύματος.

3. Παράγοντες που επηρεάζουν την επούλωση

Τοπικοί και συστηματικοί παράγοντες επηρεάζουν την επούλωση με αποτέλεσμα την καθυστέρησή της, τη μειωμένη μηχανική σταθερότητα της ουλής ή ακόμη και τη δημιουργία δύσμορφων ουλών.⁶

Στους τοπικούς παράγοντες περιλαμβάνονται η επιμόλυνση του τραύματος, η ύπαρξη ξένου σώματος, η ανεπαρκής αιμάτωση - οξυγόνωση της περιοχής, η ύπαρξη χρόνιου ερεθισμού, οιδήματος, αιματώματος, καρκινώματος, η εφαρμογή ακτινοβολιών, η τάση ή πίεση της περιοχής (π.χ. έλκη από πίεση ή κατάκλιση), κ.ά.⁷

Στους συστηματικούς παράγοντες περιλαμβάνονται η ισχαιμία, το κάπνισμα, η υποθρεψία (έλλειψη βιταμινών A, C, D, θειαμίνης, βασικών λιπαρών οξέων και ιχνοστοιχείων (ψευδαργύρου - Zn, χαλκού - Cu)), η παχυσαρκία, η μεγάλη ηλικία, φάρμακα (χημειοθεραπευτικά, γλυκοκορτικοειδή, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη), μεταβολικές νόσοι (σακχαρώδης διαβήτης), συστηματικές λοιμώξεις, χρόνιες και κακοήθειες παθήσεις, κ.ά..

4. Δράση φυτών στην επούλωση

Πολλά φυτά αποτελούν πηγή χημικών ουσιών με θεραπευτικά αποτελέσματα. Πληθώρα μελετών αναφέρεται σε φυτικά προϊόντα που αφορούν τη διαδικασία της επούλωσης.⁸ Τα φάρμακα φυτικής προέλευσης έχουν προσιτό κόστος και είναι αρκετά ασφαλή.⁹ Ωστόσο, ορισμένες φυτικές οικογένειες όπως εκείνες των Συνθέτων (Asteraceae / Compositae) έχουν ενοχοποιηθεί για αντιδράσεις υπερευαισθησίας. Τα πιο κοινά φυτά με επουλωτικές ιδιότητες είναι η καλέντουλα (καλενδούλη) (*Calendula officinalis* L), το υπερικόν το διάτρητον (*Hypericum perforatum* L), και η αλόη (*Aloe vera* L) κ.ά..

4.1. Καλέντουλα (*Calendula officinalis* L), οικογένεια Asteraceae (Συνθέτων)



Εικόνα 1. *Calendula officinalis* L¹⁰

Μικρό ετήσιο ή διετές φυτό ύψους 30-40cm, με έντονο άρωμα. Διαθέτει μία κύρια ρίζα μήκους περίπου 20cm αλλά και πολλές δευτερεύουσες.¹¹

Το χρησιμοποιούμενο φαρμακευτικά (θεραπευτικά) τμήμα του φυτού (**δρόγη**) είναι τα άνθη.

Δραστικά συστατικά: πικρές ουσίες, βλέννα, αιθέρια έλαια (0,2 - 0,3%), τριτερπενοσαπωνίνες (2 - 10%), τριτερπενεοαλκόλεις (καλεντουλαδιόλη),

τριόλες, φλαβονοειδή (φλαβοξανθίνη και αουροξανθίνη) (0,3 – 0,8%), κουμαρίνες, υδατοδιαλυτοί πολυσακχαρίτες (15%), αλκαλοειδή, βιταμίνη C, ασβέστιο (Ca^{++}), καροτένια (λουτεΐνη (80%) και ζεαξανθίνη (5%)), σημαντικές ποσότητες πυριτίου, ελεύθερα αμινοξέα (αλανίνη, αργινίνη, ασπαρτικό οξύ, ασπαργίνη, βαλίνη, ιστιδίνη, γλουταμικό οξύ, λευκίνη, λυσίνη, προλίνη, σερίνη, τυροσίνη, θρεονίνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη), καθώς και λιπίδια (ουδέτερα (15,7%), φωσφολιπίδια (0,6%), γλυκολιπίδια (0,9%).¹²

Σε πειραματικά θερμικά εγκαύματα σε μυσ η χορήγηση (20, 100, και 200 mg/kg) εκχυλίσματος ανθέων καλεντούλας βελτίωσε σημαντικά την επούλωση σε δόση των 200 mg/kg.¹¹ Τα επίπεδα των πρωτεϊνών οξείας φάσεως, όπως της τρανσαμινάσης της αλανίνης και της ασπαρτικής τρανσαμινάσης, μειώθηκαν σημαντικά, ενώ η μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσής πιθανόν να οφείλεται στην αντιοξειδωτική ιδιότητα της καλεντούλας.

Επιπλέον, οι Fronza et al¹³ διαπίστωσαν ότι εκχυλίσματα ανθέων διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό (64,35%) και τη μετανάστευση (70,53%) ινοβλαστών ακόμη και σε μικρές συγκεντρώσεις π.χ. 10 microg/ml.

Υπάρχει πληθώρα παρασκευασμάτων με καλεντούλα, όπως κρέμες, έλαια και αρώματα, βάμματα καλεντούλας, που χρησιμοποιείται σε επιθέματα για τραύματα, σε στοματοπλύματα (φαρυγγίτιδα) ή σε κολπικές πλύσεις καθώς και γαλακτώματα για μετά το ξύρισμα και για μετά την έκθεση στον ήλιο.

4.2. Υπεरिकόν το διάτρητον (*Hypericum perforatum* L), οικογένεια Hypericaceae



Εικόνα 2. *Hypericum perforatum* L¹⁴

Στην οικογένεια αυτή ανήκουν περισσότερα από 370 είδη φυτών. Είναι φυτό αυτοφυές, ύψους μέχρι 60 cm, πολυετές, φαρμακευτικό, ιθαγενές της Ευρώπης και της Ελλάδας και εν γένει των υποτροπικών

περιοχών με βλαστό όρθιο, ισχυρό, πολύκλαδο. Τα φύλλα του είναι επιφυή, μικρά, επιμήκη, ωοειδή, με στίγματα και τα άνθη κιτρινόχρυσα διάστικτα, σε ταξιανθίες (φόβες), διαμέτρου περίπου 5mm. Στην Ευρώπη συναντώνται 9 κυρίως φυτικά είδη. Ως φαρμακευτικό φυτό χρησιμοποιείται το Υπερικόν το διάτρητον L, γνωστό για τις θεραπευτικές του ιδιότητες και το ευρύτατο φάσμα των κλινικών εφαρμογών του από την αρχαιότητα.

Ιστορικά στοιχεία

Το υπερικό αναφέρεται από τους Ιπποκράτη, Γαληνό και Διοσκουρίδη ως διουρητικό, επουλωτικό, εμμηναγωγό, αιμοστατικό. Σύμφωνα με την Ιπποκράτιο Ιατρική, χορηγείτο ως ενδοκολπικός υποκλισμός σε εξελκώσεις και φλεγμονές της μήτρας μετά τον τοκετό και για παλιά έλκη της μήτρας.¹⁵ Μετά από την εφαρμογή πεσσών εχορηγείτο ως υποκλισμός έκπλυσης μαζί με φύλλα σκίνου και ελελίφασκου εντός μαύρου αρωματικού οίνου ή εντός νερού μαζί με κράμβη, λινωζώστη και κόκκινο νίτρο. Παράλληλα, εκτός της χορήγησης υποκλισμών, εδίδετο από το στόμα μαζί με άλλα βότανα για φλεγμονές της μήτρας από επίσχεση έμμηνης ρύσης αλλά και λοχιών.

Τη δρόγη αποτελούν τα υπέργεια μέρη με τους ανθοφόρους βλαστούς την εποχή της ανθοφορίας του φυτού.

Δραστικά συστατικά: Στο αποξηραμένο τμήμα του φυτού ανευρίσκεται 0,1-0,3% υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη (ναφθοκινόνες) καθώς και παράγωγα. Η δρόγη περιέχει υπερικίνη και ψευδο-ϋπερικίνη, ξανθόνες, φαινολικά οξέα, αιθέρια έλαια (0,13% σε ολόκληρο το φυτό). Το αιθέριο έλαιο περιέχει α-πιπένιο και σεσκιτερπενικούς υδρογονάνθρακες. Επίσης, το φυτό περιέχει φλαβονοειδή 0,5-1% με κύριο χημικό συστατικό την υπεροσίδη 0,05-0,3%, διφλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβονογλυκοσίδες, ναφθοδιανθρόνες, φθοριογλυκινόλες, ταννίνες, κουμαρίνες, ξανθοφυλλίνες, κατεχίνες 0,1%, το παράγωγο φλωρογλυκίνης, την υπερφορίνη, σε ποσοστό περίπου 4% και άλλα.¹⁶⁻¹⁸

Το υπερικό διαθέτει πλήθος ιδιοτήτων: σε από του στόματος χορήγηση αντικαταθλιπτικές (συνταγογραφούμενο πρώτης επιλογής αντικαταθλιπτικό - 50% της συνολικής αγοράς αντικαταθλιπτικών στη Γερμανία), αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικές, επουλωτικές, μυοχαλαρωτικές, αντιοξειδωτικές κλπ.¹⁹

Οι αναλγητικές του ιδιότητες αποδίδονται στις υπερικίνη, ψευδοϋπερικίνη φλαβονοειδή και υπερφορίνη. Η υπερικίνη *in vitro* ελαττώνει τη σύνθεση κυταροκινών (IL-12) σε μακροφάγα μυών ενεργοποι-

Πίνακας 1. Βιοχημικά ευρήματα της δράσης ελαιώδους εκχυλίσματος *Hypericum perforatum* L 10% Herba /soja oil σε σχέση με παράγοντες φλεγμονής (IL-2,IL-6) και αντιοξειδωτικής δράσης (γλουταθειόνη) σε πειραματική Freund adjuvant αρθρίτιδα επιμύων ²⁸.

Ομάδες M±SD	Ομάδα ελέγχου	Ομάδα ελέγχου με <i>Hypericum perforatum</i> II	CFA αρθρίτιδα III	CFA αρθρίτιδα με <i>Hypericum perforatum</i> IV
Ρευματοειδής Παράγοντας IU/ml	> 9,5	> 9,5	15,65 ± 0,01*	10,5 ± 0,2*
C-αντιδρώσα πρωτεΐνη mg/L	> 3,5	> 3,5	5,3 ± 0,3*	4,1 ± 0,02*
Ολικές Πρωτεΐνες (g/dl)	6,9 ± 0,1	7 ± 0,5	6,15 ± 0,02*	6,35 ± 0,2*
Αλβουμίνη (g/dl)	4,1 ± 0,01	4,25 ± 0,01	3 ± 0,02	3,7 ± 0,02*
Γλοβουλίνη (g/dl)	2,41 ± 0,21	2,56 ± 0,04	4,4 ± 0,2	4,01 ± 0,3
Ιντερλευκίνη-2 (IU/ml)	24.04 ± 2.7	22,3 ± 2,6	30,1 ± 2.3	29.84 ± 2.96
Ιντερλευκίνη-6 (IU/ml)	0,04 ± 0,02	0,2 ± 0,08	0,44 ± 0,18	0,43 ± 0,12
Γλουταθειόνη (GSH) μg/ml	0,40±0,03**	0,65 ± 0,05	0,30 ± 0,07**	0,41 ± 0,02

Ομάδες *I/III (p < 0,05) *II/IV p<0,5 # III/IV p<0,5 *p<0,05 **p<0.01

ημένων με λιποπολυ-σακχαρίτες (LPS), πιθανόν σε επίπεδο μεταγραφής. Ακόμη, παρατηρείται αύξηση ή σταθεροποίηση των βοηθητικών *T-κυττάρων* για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά από καθημερινή λήψη, από το στόμα και ενδοφλεβίως, 1-2mg υπερικίνης. Νεώτερα δεδομένα υποστηρίζουν την αντικαταθλιπτική δράση της υπερφορίνης. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η υπερφορίνη *in vivo* και *in vitro* επηρεάζει τη λειτουργία των κυττάρων Langerhans της επιδερμίδας και αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων. Οι δράσεις αυτές εξηγούν την τοπική χρήση της ουσίας σε δερματικά νοσήματα.²⁰

Το υπερικό, ως παραδοσιακό θεραπευτικό μέσο, χρησιμοποιείται ως εκχύλισμα της δρόγης σε έλαιο (ελαιόλαδο στην Ελλάδα) τοπικά για την επούλωση ελκών, εγκαυμάτων πρώτου βαθμού, αλλά και μυϊκών πόνων (μυαλγιών). Το εκχύλισμα υπερικού του είδους *Hypericum patulum* προάγει την επούλωση τραυμάτων και ελκών σε πειραματικά τραύματα πειραματοζώων, ενώ παρασκευάσματα συνδυασμού

εκχυλισμάτων υπερικού και καλεντούλας διαθέτουν αυξημένη επουλωτική ικανότητα.¹³⁻²¹ Το υπερικόν ασκεί επουλωτική δράση ακόμη και παρουσία διαταραχών του ανοσοποιητικού συστήματος.^{22,23} Παρασκευάσματα από ελαιώδη εκχυλίσματα υπερικού εφαρμόζονται εξωτερικά σε λύση της συνεχείας δέρματος/βλεννογόνων (κοπτικά ή θερμικά/εγκαύματα). Ως πλύμα, η δρόγη του υπερικού επιταχύνει την θεραπεία των κηρμών.¹⁹

Ακόμη, έχει ήδη τεκμηριωθεί ότι το stress, μέσω της αύξησης ορμονών και νευρομεταβιβαστών, επιδεινώνει την επούλωση τραύματος. Επιπλέον, η λύση ιστού αποτελεί στρεσογόνο ερέθισμα. Η επουλωτική ιδιότητα του υπερικού αποδίδεται στην αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών αλλά και στην αναστολή της επαναπρόσληψης σεροτονίνης και νοραδρεναλίνης. Το φλαβονοειδές αμεντοβλαφρόνη, του υπερικού, αναστέλλει τη σύνδεση της φλουμαζενίλης στον υποδοχέα των βενζοδιαζεπινών GABA A-receptor (IC₅₀ = 14.9 nM), γεγονός που συνδέει την

αντικαταθλιπτική δράση του με την προαγωγή της επούλωσης.²⁴

Επιπρόσθετα, έχει δείχθει ότι το υπερικόν προστατεύει τους επίμυνες από στρεσογόνες συνθήκες (έλκος ΓΕΣ μετά από stress κολύμβησης).²⁵

Επίσης, προκαλεί προς τα άνω ρύθμιση των β-αδρενεργικών υποδοχέων και προς τα κάτω ρύθμιση των υποδοχέων σεροτονίνης στο μετωπιαίο φλοιό των επιμύων. Το υπερικό, επιπλέον, περιορίζει το ρυθμό αποδόμησης της ακετυλοχολίνης, επιδρώντας στην ακετυλο-χολινεστεράση Ach-E.²⁶

Οι Samadi et al,²⁷ μελέτησαν την αποτελεσματικότητα της δράσης του υπερικού κλινικά στην πρόληψη της ανάπτυξης υπερτροφικής ουλής κατά την μετεγχειρητική επούλωση καισαρικής τομής. Σε τυχαιοποιημένη διπλή τυφλή κλινική μελέτη 144 γυναικών (χωρισμένων σε 3 ομάδες), με καισαρική τομή (όλες από δύο συγκεκριμένους μαιευτήρες), χορηγήθηκε παρασκευάσμα αλοιφής υπερικού, placebo και καμία άλλη αγωγή. Η αξιολόγηση της επούλωσης έγινε τη 10^η μέρα με την κλίμακα REEDA (ερυθρότητα, οίδημα, εκχύμωση) και τη 40^η μέρα με τη Vancouver Scar Scale (VSS) (με εύρος 0 ως το 14 σε σχέση με: χρωματισμό, ύψος, ευκαμψία, αγγείωση). Την 40^η μέρα αξιολογήθηκε η κλίμακα πόνου, το αίσημα κνησμού, καθώς και η επούλωση. Το υπερικό έδειξε καλύτερα αποτελέσματα και στις δύο παρατηρήσεις. Πιθανόν τα αποτελέσματα να αποδίδονται στην αμεντοβλαφόνη, την υπερικίνη (αντιφλεγμονώδης δράση) και την υπερφορίνη, με αντιμικροβιακή δράση έναντι gram (+) βακτηρίων. Επιπλέον, τα φλαβονοειδή του εκχυλίσματος πιθανόν να ευθύνονται για αύξηση των ινοβλαστών, σύνθεση κολλαγόνου, αλλά και πολλαπλασιασμό και μετανάστευση επιθηλιακών κυττάρων.²⁷

Επίσης, σε μια άλλη μελέτη, όπως αναδεικνύεται και από τον Πίνακα 1, κατά τη θεραπευτική αγωγή με ελαιώδες εκχύλισμα *Hypericum perforatum* L 10% Herba /soja oil σε πειραματική Freund adjuvant αρθρίτιδα επιμύων, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης και ελάττωση των ιντερλευκινών.²⁸

Παρασκευάσματα: Remotive (0,2% υπερικίνη και αμελητέες ποσότητες υπερφορίνης), Jarsin (4-5% υπερφορίνης), Neuropant (4-5% υπερφορίνης), Psychotonic, Hyperforat², Nature's Plus St. John's Wort 450mg 60tabs, St. John's wort 170mg εκχυλίσματος 8:1, που αντιστοιχούν σε 0,5mg υπερικίνης ανά δισκίο, Neucan 300 - Hypericum Perforatum 300mg, από τιτλοποιημένο εκχύλισμα υπερφορίνης και υπερικίνης²⁹, και Primavera Βάλσαμο σε Ελαιόλαδο (Σπαθόλαδο) Bio 100ml^{22,23,30}

4.3. Αλόη (*Aloe vera* L), οικογένεια Liliaceae (Λειριώδη)



Εικόνα 3. *Aloe vera* L³¹

Φυτό πολυετές, με σαρκώδη φαιοπράσινα φύλλα αγκαθωτά στην περιφέρεια πλατιά στην βάση και στενά και ακανθώδη στη κορυφή, μήκους 20-50cm με λευκά στίγματα. Τα άνθη σωληνοειδή, πορτοκαλοκίτρινα, με πέταλα μήκους 3cm, είναι συγκεντρωμένα στη κορυφή κεντρικού μίσχου. Προέρχεται από την Αφρική. Αυτοφύεται σε πολλά νησιά της Ελλάδας (Κάλυμνο, Λέρο, Άνδρο) και άλλες περιοχές.

Ιστορικά στοιχεία: Η αλόη είχε χρησιμοποιηθεί στην αρχαιότητα, σύμφωνα με τοιχογραφίες των πυραμίδων, ως μαγικό και θαυματουργό βότανο. Αναφορές για την παρουσία φυτών που αναφέρονται σε αλόη σε παραθαλάσσιες περιοχές -ιδιαίτερα στην Άνδρο και τα νησιά- έχει κάνει ο Διοσκουρίδης, ο Πλίνιος ο Γαληνός και οι Άραβες (Al Kindi 900 μ.Χ.). Το 17^ο αιώνα η αγγλική εταιρία των Ανατολικών Ινδιών αγόραζε το σύνολο της παραγωγής από το βασιλιά της νήσου Σοκότρα, νότια της Ερυθράς Θάλασσας. Από αλόη είχε παρασκευαστεί σε μείγμα με σμύρνα άρωμα που χρησιμοποιήθηκε κατά τον ενταφιασμό του Χριστού: «*Ἦλθε δε και ο Νικόδημος ο ελθών προς τον Ιησούν νυκτός το πρώτον, φέρων μίγμα σμύρνης και αλόης ως λίτρας εκατόν*» Κατά Ιωάννην ΙΘ 39.

Δρόγη: Ο χυμός των πρισματικών κυττάρων των φύλλων της αλόης (γέλη).

Δραστικά συστατικά: Ανθρακινόνη αποτελούμενη από πικρό γλυκοζίτη της ανθρόνης, την αλοΐνη Α και Β (35-38%), και από αραβινόζη και εμοδίνη (0,05-0,5%). Περιέχει, ακόμα, ρητίνες, πικρές γλυκοσίδες (Αλοεΐνη Α και Β), φλαβονοειδή, πολυσακχαρίτες (κυρίως μαννόζη καθώς και ακεμαννάνη), αλοερεσκίνη Β της ομάδας της 2-αλκυλοχρωμόνης και αιθέρια έλαια.³² Σε μικρές δόσεις η αλοΐνη διεγείρει την έκκριση γαστρικών υγρών, ενώ σε μεγαλύτερες

δόσεις είναι καθαρτική και εμμηναγωγός. Οι ανθρακίνες στο παχύ έντερο παρουσία ενζύμων διασπώνται σε ελεύθερη ανθρακίνη και σάκχαρα.³³

Δράσεις: Η ακεμαννάνη, συνδεδεμένη με αυξητικούς παράγοντες, συμβάλλει στην περαιτέρω διέγερση του κοκκιώδους ιστού. Φαίνεται να προάγει την επιθηλιοποίηση σε τέμνοντα τραύματα ακόμη και σε διαβητικό υπόστρωμα.

Πέραν της επουλωτικής δράσης η αλόη έχει υπαρκτική δράση αυξάνοντας την έκκριση σακχάρων και ηλεκτρολυτών στον εντερικό αυλό, ενώ συγχρόνως αναστέλλεται η επαναρρόφησή τους. Η αύξηση του όγκου του εντερικού περιεχομένου διεγείρει το γαστρεντερικό αντανακλαστικό (κινητικότητα, περισταλισμό) και οδηγεί σε κάθαρση-αφόδευση.³⁴ Επιπλέον, έχει χολεκκριτική δράση. Οι ανθρόνες αυξάνουν την αιμάτωση στην ελάσσονα πύελο και το μυϊκό τόνο της μήτρας, ενώ σε εγκύμονα μήτρα μπορεί να προκληθούν ωδίνες και αποβολή του εμβρύου.

Η αλόη πιστεύεται ότι έχει μυκητοκτόνες, αντιφλεγμονώδεις, ανθελμινθικές, αντικαρκινικές, βακτηριοκτόνες και επουλωτικές ιδιότητες που αποδίδονται στις τανίνες και τα φλαβονοειδή.^{35,36} Επιπλέον, τα φλαβονοειδή ευθύνονται και για την αντιοξειδωτική της δράση.³⁷ Πρόσφατες μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι η αλόη έχει αντικαρκινική δράση επηρεάζοντας ηπατικά και εξωηπατικά ένζυμα, τα οποία συμβάλλουν στην απομάκρυνση δραστικών μεταβολιτών, χημικών καρκινογόνων και φαρμάκων.³⁸

Η αλόη, επιπλέον, αναστέλλει την ηπατοτοξικότητα της ναφθοκινόνης σε ηπατικά κύτταρα επιμύων διατηρώντας σε φυσιολογικά επίπεδα τη γλουταθειόνη και την SH-πρωτεΐνη. Ακόμη, δείχθηκε ότι μίγμα αλόης και σίλυβου (*Silybum marianum* L) ανατάσσει ηπατικές βλάβες από CCl₄ σε πειραματόζωα.³⁹

Επίσης, η αλόη θεωρείται ότι έχει προστατευτική δράση στο γαστρικό βλεννογόνο συγκρίσιμη εκείνης της σουκραλφάτης αλλά και σε νεοπλάσματα του γαστρεντερικού.^{40,41} Συζητείται πιθανή ευεργετική δράση της ακεμαννάνης σε χρόνιες φλεγμονές του εντέρου.

Η εμοδίνη της αλόης αναστέλλει *in vitro* την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων που εξορμούνται από τα κύτταρα Merkel της βασικής στιβάδας της επιδερμίδας και έχει εκλεκτική δράση στα καρκινικά κύτταρα που εξορμούν από το εκτόδερμα.⁴² Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί κυτταροπροστατευτική δράση σε νευρωνικά κύτταρα του υποκάμπου. Ο συνδυασμός αλόης-εμοδίνης προκαλεί απόπτωση καρκινικών κυττάρων διαφόρου προελεύσεως (ρινικού βλεννογόνου, μέσω ενεργοποίησης μιτοχονδριακού θανάτου από την κασπάση-8, ηπατώματος), μεταβάλλοντας τις οξειδωτικές διεργασίες του υποστρώ-

ματος.^{38,43} Η ακεμαννάνη, συνδεδεμένη με αυξητικούς παράγοντες, συμβάλλει στην περαιτέρω διέγερση του κοκκιώδους ιστού. Φαίνεται να προάγει την επιθηλιοποίηση σε τέμνοντα τραύματα ακόμη και σε διαβητικό υπόστρωμα.

Τοπικά ο *χυμός αλόης* ενδείκνυται σε εγκαύματα, άτονα έλκη, ψωρίαση, έκζεμα, ακμή και γενικά επούλωση ελκών ερπητικής συνδρομής, ακόμη και σε έρπη γεννητικών οργάνων.⁴⁴⁻⁴⁹ Σε εγκαύματα βελτιώνει την επούλωση αυξάνοντας την αιμάτωση των ιστών και την προσκόλληση των λευκοκυττάρων επί της ιστικής βλάβης. Φαίνεται μάλιστα ότι δρα προληπτικά στην ανοσοκαταστολή που προκαλεί η υπερϊώδης ακτινοβολία στα κύτταρα Langerhans της επιδερμίδας. Η δράση αυτή αποδίδεται στην ακεμαννάνη (πολυσακχαρίτη) που προκαλεί φαινοτυπική και λειτουργική ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων του μυελού των οστών σε μυς, με αυξημένη παραγωγή της ιντερλευκίνης IL-10, IL-12.⁵⁰ Η ακεμαννάνη φαίνεται να ενισχύει τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.⁵¹

Η *γέλη της αλόης* έχει, επίσης, δειχθεί σε τυχαioποιημένες μελέτες ότι δρα αποτελεσματικά έναντι της ψωρίασης.⁴⁷ Αξιόλογη είναι η επουλωτική της δράση σε έλκη του δέρματος, ενώ φαίνεται να έχει ευεργετική δράση στην αντιμετώπιση της αφθώδους στοματίτιδας με την εφαρμογή -ειδικά σε παιδιατρικούς ασθενείς- προσκολλητικών επιθεμάτων που παρέχουν βελτίωση των επώδυνων συμπτωμάτων αλλά και καλύτερη συμμόρφωση στη θεραπευτική αγωγή.⁵² Δεν συνιστάται ωστόσο η χρήση σε παιδιά κάτω των 12 ετών. Πέραν της επουλωτικής δράσης η γέλη της αλόης ασκεί επίσης αντιφλεγμονώδη δράση και αναστέλλει την κυκλοοξυγονάση-2 (COX-2) και την θρομβοξάνη A₂, ενώ αυξάνει τον σχηματισμό κολλαγόνου και πρωτεογλυκανών.³⁴ Η γέλη της αλόης αποτρέπει τη βάση πολλών προϊόντων στη βιομηχανία των καλλυντικών ως μαλακτικών και ενυδατικών παραγόντων του δέρματος. Η τοπική χρήση της γέλης της αλόης έχει εφαρμογή σε φλεγμονές του δέρματος, έλκη, εγκαύματα, χείμετλα (χιονίστρες) και ακμή. Βελτιώνει, επιταχύνει και υποβοηθά την επούλωση τραυμάτων τόσο υγιών ατόμων όσο και διαβητικών ασθενών.^{46,51,53}

Στο Σχήμα 2 συνοψίζεται η δράση της αλόης στην επούλωση τραύματος.⁵⁴

Τέλος, το *συμπυκνωμένο εκχύλισμα αλόης* έχει χρησιμοποιηθεί ενδομυϊκά σε συνδυασμό με αντιβίωση για την αντιμετώπιση εγκεφαλίτιδας.⁵⁵

Άλλες χρήσεις της αλόης: Εκχύλισμα μεθανόλης από φύλλα αλόης 1/1000 αδραντοποιεί *in vitro* καλλιέργειες ιού έρπητα 1 και 2.^{44,56} Υδατικό διάλυμα νωπού χυμού φύλλων αλόης έχει εμφανίσει βακτηριοστα-



Σχήμα 2. Δράση της αλόης στην επούλωση τραύματος (αύξηση της αντοχής του τραύματος στον εφελκυσμό), τροποποιημένο από την παραπομπή⁵⁴.

τική δράση έναντι των βακτηρίων *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyrogenes*, *Corynebacterium* και *Salmonella paratyphie*. Επιπλέον, λόγω της αντιμικροβιακής της δράσης έναντι μικροοργανισμών *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Prevotella intermedia* και *Peptostreptococcus anaerobius* η χρήση οδοντοφυράματος τόσο υπό μορφή γέλης όσο και υπό μορφή πάστας παρουσιάζει ικανοποιητική δράση στη ρύθμιση παθολογικής χλωρίδας της στοματικής κοιλότητας.⁵⁷

Η κόνη αλόης (χυμός από τα φύλλα της βάσης του φυτού, αποξηραμένο εκχύλισμα) χρησιμοποιείται βραχυχρόνια ως υπακτικό σε συρίγγια του πρωκτού, αιμορροΐδες, και σε ορθο-πρωκτικούς χειρισμούς κατά τη φάση παρακλινικών εξετάσεων.

Η συστηματική χορήγηση του χυμού αλόης συνιστάται σε χρόνια δυσκοιλιότητα (ιδιαίτερα ύστερα από λήψη σκευασμάτων σιδήρου), σε έλκος στομάχου και δωδεκαδακτύλου, καθώς και σε διαταραχές του πεπτικού ύστερα από ακτινοθεραπεία. (Ως υπακτικό έχει θετική μονογραφία ESCOP)

Να σημειώσουμε ότι όταν λαμβάνεται ως καθαρτικό πρέπει να συνδυάζεται με μαλακτικά βότανα, όπως η μολόχα, ο μάραθος και το χαμομήλι για να μην εκδηλωθούν κωλικοί στον ΓΕΣ.

Σε πειραματικό διαβήτη τύπου I και II σε επίμυς εκχύλισμα πολτού φύλλων αλόης δρα υπογλυκαιμικά, ειδικότερα στο μη ινσουλινεξαρτώμενο διαβήτη. Έχει μεγαλύτερη υπογλυκαιμική δράση και από την γκλιβενκλαμίδη.^{57,58}

Στο εμπόριο κυκλοφορούν πολλά καλλυντικά σκευάσματα με χυμό αλόης (αντηλιακά, δερματικές αλοιφές, σαπούνια, καλλωπιστικά των μαλλιών),

αλλά η αποτελεσματικότητά τους διαφέρει λόγω διαφορετικών συγκεντρώσεων σε γέλη φύλλων αλλά και λόγω συχνής νοθείας.

Τοξικότητα της αλόης: Τα οξέα και χρόνια συμπτώματα τοξικότητας από αλόη αποδίδονται στα προϊόντα αποδόμησης της ανθρόνης από τη χλωρίδα του εντέρου. Σε μεγάλες δόσεις μπορεί να εμφανιστεί αυξημένη διούρηση, αιματουρία, νεφρίτιδα, σοβαρές αιματηρές διάρροιες, μητρορραγία, τεινσμός, αποβολή κήματος. Όσον αφορά την καρκινογένεση δεν υπάρχουν σαφή στοιχεία. Περιγράφεται μελάνωση του εντέρου μετά από 10μηνη αυτοχορήγηση προϊόντος που περιείχε αλόη σε ασθενή με μεταμόσχευση ήπατος η οποία παρατηρείται μετά από λήψη καθαρτικών πλούσιων σε ανθρακινόνες.⁵⁹ Ιστολογικά επρόκειτο περί αδενώματος. Γενικά πρέπει να αποθαρρύνεται η μακροχρόνια χρήση σκευασμάτων που περιέχουν ανθροκινόνες, καθώς δεν έχουν ενοχοποιηθεί για μελάνωση του παχέος εντέρου.

Ανεπιθύμητες ενέργειες: Σε βραχυχρόνια χορήγηση δεν έχουν αναφερθεί. Σε χρόνια λήψη/κατάχρηση μπορεί να παρατηρηθούν απώλεια ηλεκτρολυτών, κυρίως απώλεια K⁺. Η υποκαλιαιμία μπορεί να οδηγήσει σε μυϊκή αδυναμία και δυσανεξία της αγωγής με δακτυλίτιδα. Έχει παρατηρηθεί μελάνωση του εντέρου και χωρίς κλινική σημασία ερυθρά χρώση των ούρων.⁵⁹ Λόγω της αύξησης της αιμάτωσης στην ελάσσονα πύελο, μπορεί να είναι πιο έντονη η αιμορραγία του καταμήνιου κύκλου, στη δε εγκυμοσύνη μπορεί να οδηγήσει σε αποβολή του κήματος. Η γέλη της αλόης σε επαφή με το δέρμα μπορεί να προκαλέσει αλλεργία, κνησμό και αίσθημα καύσου.

Αντενδείξεις: Αντενδείκνυται σε ειλεό, οποιασδήποτε αιτιολογίας, σε οξείες φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου, στην εγκυμοσύνη και γαλουχία, σε παιδιά κάτω των 12 ετών, σε πόνους στο υπογάστριο αγνώστου αιτιολογίας και σε νεφρικές νόσους. Επίσης, πρέπει να αποφεύγεται η τοπική εφαρμογή στο δέρμα μετά από χημική απολέπιση (peeling).

Αλληλεπιδράσεις: Αλληλεπιδρά με τη δακτυλίτιδα, λόγω απώλειας K⁺ και επηρεάζει την αντιαρρυθμική αγωγή. Η σύγχρονη χορήγηση με θειαζδικά διουρητικά, κορτικοστεροειδή ή γλυκώριζα μπορεί να αυξήσει την απώλεια K⁺.

Έχει θετική μονογραφία στον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA) από την Επιτροπή φαρμάκων φυτικής προέλευσης (HMPC) καθώς και από την ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapy) και ΠΟΨ (Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας).⁶⁰

5. Συμπεράσματα

Η επούλωση ενός τραύματος αποτελεί πολύπλοκη διεργασία. Παρασκευάσματα φυτικής προέλευσης εμφανίζουν θετικά αποτελέσματα, ανάλογα ή και θετικότερα των συνθετικών φαρμάκων. Μεταξύ των φυτών που διαθέτουν επουλωτικές ιδιότητες αποτελεσματικότητα επιδεικνύουν η καλέντουλα (άνθος), το υπερικό (βάλσαμο ή σπαθόχορτο) (ανθισμένα υπέργεια μέρη), η αλόη (γέλη) κ.ά., των οποίων η επουλωτική δράση έχει τεκμηριωθεί πέραν της παραδοσιακής χρήσης τους και από *in vitro* και *in vivo* μελέτες.

Σκόπιμη θεωρείται η περαιτέρω έρευνα των ιδιοτήτων των φυτών για τη δυνατότητα χρησιμοποίησής τους στη διαδικασία της επούλωσης τραυμάτων αλλά και γενικότερα στη Θεραπευτική, καθώς και η μελέτη των αλληλεπιδράσεών τους με σκοπό την ανεύρεση του καταλληλότερου και δραστικότερου συνδυασμού στην εκάστοτε θεραπεία.

Medicinal Plants in Wound Healing

Dimitra Voudouri, Christina Tesseromati

Laboratory of Experimental Pharmacology, School of Medicine, University of Athens, Mikras Asias 75, Goudi 11527, Athens, Greece.

Summary

Wound healing is a complex procedure. Herbal preparations show positive results and they often outweigh synthetic drugs. Among the plants with healing properties, the ones that demonstrate effectiveness in cutaneous use and their healing action has been documented by *in vitro* and *in vivo* studies are: *Calendula officinalis* (the flowers), *Hypericum perforatum* (the flowering aerial parts), and *Aloe vera* (gel). In the present review, the active constituents, the properties and actions of the above medicinal plants as well as their use in wound healing and other therapies are discussed.

Further investigation of the properties of such plants would be very useful in order to establish their application in wound healing and generally in therapy. Moreover, the study of their interactions may demonstrate the most appropriate and effective combination in such treatments.

Βιβλιογραφία

1. Φυτικά φάρμακα. (χ.χ.) (Ανακτήθηκε 1/11/2012). Διαθέσιμο στο δικτυακό τόπο: http://www.tmth.edu.gr/aet/thematic_areas/p334.html
2. Τεσσερομμάτη Χ., (2012). *Φαρμακολογία της σύγχρονης αυτοθεραπείας: Φυτικής προέλευσης σκευάσματα*. Αθήνα: Gutenberg
3. Παυλίδης Ε., (2011). *Η επίδραση της Bevacizumab στην επούλωση των αναστομώσεων του παχέος εντέρου (Πειραματική μελέτη σε επίμυες)*. Θεσσαλονίκη: Α.Π.Θ.
4. Beanes R., Dang C., Soo C., Ting K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF-beta. *Expert Rev. Mol. Med.* 5, 1–22, 2003.
5. Boron W., Boulpaep E., (2006). *Ιατρική Φυσιολογία: Κυτταρική και μοριακή προσέγγιση*. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
6. Μανδρέκας, Α. *Τραύμα – ούλη και επούλωση*. Οκτώβριος 2009 (ανακτήθηκε 1/11/2012). Διαθέσιμο στο δικτυακό τόπο: http://www.mylook.gr/sections/odigos_plastikis_xeiorourgikis/articles/1/travma_oules_epoulosi.html
7. Σφηκιάκης Π., (2008). *Προβλήματα σχετιζόμενα με τη διαχείριση του χειρουργικού τραύματος: Διαχείριση του τραύματος- Παράγοντες που επηρεάζουν την επούλωση*. Αθήνα: Ελληνική Χειρουργική Εταιρία (Μετεκπαιδευτικά σεμινάρια χειρουργικής, 23^η σειρά)
8. Nagori B., Solanki R. Role of medicinal plants in wound healing. *Res. J. Medic. Plant* 5, 392–405, 2011.
9. Raina R., Prawez S., Verma P.K., Pankaj N.K. Medicinal Plants and their Role in Wound Healing. *Vet Scan* 3, 1–7, 2008.
10. *Plant Profile: Calendula*. (χ.χ.) (Ανακτήθηκε 1/11/2012). Διαθέσιμο στο δικτυακό τόπο: <http://www.abc.net.au/gardening/stories/s1866606.htm>
11. Muley B.P., Khadabadi S.S., Banarase N.B. Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A Review. *Trop. J. Pharm. Res.* 8, 455–465, 2009.
12. Baeumler S., (2007). *Heilpflanzen Praxis Heute*. Jena, Muenchen; Urban & Fischer
13. Fronza M., Heinzmann B., Hamburger M., Laufer S., Merfort I. Determination of the wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *J. Ethnopharmacol.* 126, 463–7, 2009.
14. *kuleuven-kortrijk.be – taxus baccata, ostracoda, ostracoda, veronica plante, pijn*. (χ.χ.) (Ανακτήθηκε 1/11/2012). Διαθέσιμο στο δικτυακό τόπο: <http://static.52.53.4.46.clients.your-server.de/domain/kuleuven-kortrijk.be/#>
15. Littré É., (1839). *Oeuvres complètes d'Hippocrate*. Paris: J. B. Baillière
16. Roth L., Daunderer M., Kormann K.

- Giftpflanzen, Pflanzengifte (1994) 4th ed. Ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co KG, Landsberg p.p.415-19.
17. T. Dingermann, K. Hiller, G. Schneider, I. Zündorf, (2004) Schneider -Arzneidrogen, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag
 18. Van Wyk B-E., Wink C., Wink M.I. (2004) Handbuch der Arzneipflanzen. Wissenschaftliches. 2nd edition p. 175.
 19. Kolaci M., Γκόγκου Π., Πέτρου Α., Πέτσιου Β., (2007). *Τα είδη του Hypericum*. Θεσσαλονίκη: Α.Π.Θ.
 20. Rabanal R.M., Bonkanka C.X., Hernández-Pérez M. Analgesic and topical anti-inflammatory activity of *Hypericum canariense* L. and *Hypericum glandulosum* Ait. *J. Ethnopharmacol.* 96, 591-6, 2005.
 21. Reuter J., Merfort I., Schempp CM. Botanicals in dermatology: an evidence-based review. *Am. J. Clin. Dermatol.* 11, 247-67, 2010.
 22. Sapounakis C., Kotsiou A., Potamianou A., Tsamouri M., Vovou J., Tesseromatis C. *Hypericum perforatum* L induced wound healing process in Freund's adjuvant arthritic rats. *Aust. J. Med. Herb.* 23, 30-33, 2011.
 23. Sapounakis C., Tesseromatis C. *Hypericum perforatum* L.: A traditional remedy with new indications. *Rev. Clin. Pharmacol Pharmacokin., Int. Ed.* 23, 73-76, 2009.
 24. Gutmann H., Bruggisser R., Schaffner W., Bogman K., Botomino A., Drewe J. Transport of amentoflavone across the blood-brain barrier in vitro. *Planta Med.* 68, 804-7, 2002.
 25. Abdel-Salam O.M. Anti-inflammatory, antinociceptive, and gastric effects of *Hypericum perforatum* in rats. *Sci. World J.* 5, 586-95, 2005.
 26. Zdunić G., Godevac D., Milenković M., Vucićević D., Savikin K., Menković N., Petrović S. Evaluation of *Hypericum perforatum* oil extracts for an antiinflammatory and gastroprotective activity in rats. *Phytother Res.* 23, 1559-64, 2009.
 27. Samadi S., Khadivzadeh T., Emami A., Moosavi N., Tafaghodi M., Behnam HR. The effect of *Hypericum perforatum* on the wound healing and scar of cesarean. *J. Altern. Complement. Med.* 16, 113-17, 2010.
 28. Kotsiou A., Zissaki A., Sapounakis K., Tesseromatis C., (2011). Effect of *Hypericum perforatum* L extract on serum glutathione to skin wound of rats. *5th International Conference on "Oxidative stress in skin biology and medicine", September 1-4, 2011, Andros island, Greece.*
 29. *Rote Liste 2012*. Frankfurt: Rote Liste Service GmbH
 30. Σαπουνάκης Κ., Χατζηγιάννη Ε., Κώτσιου, Α., Τεσσαρομμάτη Χ. Επίδραση του υπερικού του διάτρητου (*Hypericum perforatum* L) στην επούλωση τραύματος δέρματος επιμύων. *Pharmakeftiki.* 24, 40-41, 2012.
 31. *Aloe Vera*. (χ.χ.) (Ανακτήθηκε 1/11/2012). Διαθέσιμο στο δικτυακό τόπο: <http://guidealoevera.com/>
 32. Ni Y., Yates K.M., Tizard I.R. (2004) Aloe polysaccharides. In: Reynolds, T. *Aloes The Genus Aloe*. CRC Press, Boca Raton, pp. 75-87.
 33. Alves D.S., Pérez-Fons L., Estepa A., Micol V. Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin. *Biochem. Pharmacol.* 68, 549-561, 2004.
 34. Yagi A., Kabash A., Mizuno K., Moustafa SM., Khalifa TI., Tsuji H. Radical scavenging glycoprotein inhibiting cyclooxygenase-2 and thromboxane A2 synthase from aloe vera gel. *Planta Med.* 69, 269-71, 2003.
 35. Pandey R., Mishra A. Antibacterial activities of crude extract of *Aloe barbadensis* to clinically isolated bacterial pathogens. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 1356-61, 2010.
 36. Tian B., Hua YJ., Ma XQ., Wang GL. Relationship between antibacterial activity of aloe and its anthraquinone compounds. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 28, 1034-7, 2003.
 37. Keyhanian S., Stahl-Biskup E. Phenolic constituents in dried flowers of aloe vera (*Aloe barbadensis*) and their in vitro antioxidative capacity. *Planta Med.* 73, 599-602, 2007.
 38. Lu G.D., Shen H.M., Chung M.C., Ong C.N. Critical role of oxidative stress and sustained JNK activation in aloe-emodin-mediated apoptotic cell death in human hepatoma cells. *Carcinogenesis* 28, 1937-45, 2007.
 39. Kim S.H., Cheon H.J., Yun N., Oh S.T., Shin E., Shim K.S., Lee S.M. Protective effect of a mixture of *Aloe vera* and *Silybum marianum* against carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity and liver fibrosis. *J. Pharmacol. Sci.* 109, 119-27, 2009.
 40. Chen W., Lu Z., Viljoen A., Hamman J. Intestinal drug transport enhancement by *Aloe vera*. *Planta Med.* 75, 587-95, 2009.
 41. Eamlamnam K., Patumraj S., Visedopas N., Thong-Ngam D. Effects of *Aloe vera* and sucralfate on gastric microcirculatory changes, cytokine levels and gastric ulcer healing in rats.

- World J. Gastroent.* 12, 2034-9, 2006.
42. Chaudhary G., Saini M.R., Goyal P.K. Chemopreventive potential of Aloe vera against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced skin papillomagenesis in mice. *Integr. Cancer Ther.* 6, 405-12, 2007.
 43. Lin M.L., Lu Y.C., Chung J.G., Li Y.C., Wang S.G., N G S.H., Wu C.Y., Su H.L., Chen S.S. Aloe-emodin induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells via caspase-8-mediated activation of the mitochondrial death pathway. *Cancer Lett.* 291, 46-58, 2010.
 44. Aloe L. Intraocular herpes simplex virus injection in neonatal rats induces sympathetic nerve cell destruction: effect of nerve growth factor. *Int. J. Dev. Neurosci.* 5, 357-66, 1987.
 45. Choonhakarn C., Busaracome P., Sripanidkulchai B., Sarakarn P. A prospective, randomized clinical trial comparing topical aloe vera with 0.1% triamcinolone acetonide in mild to moderate plaque psoriasis. *J. Eur. Acad. Derm. Vener.* 24, 168-72, 2010.
 46. Mendonça F.A., Passarini Jr J.R., Esquisatto M.A., Mendonça J.S., Franchini C.C., Santos G.M. Effects of the application of Aloe vera (L.) and microcurrent on the healing of wounds surgically induced in Wistar rats. *Acta Cir. Bras.* 24, 150-5, 2009.
 47. Morelli V., Calmet E., Jhingade V. Alternative therapies for common dermatologic disorders, part 2. *Prim Care* 37, 285-96, 2010.
 48. Perfect M.M., Bourne N., Ebel C., Rosenthal S.L. Use of complementary and alternative medicine for the treatment of genital herpes. *Herpes* 12, 38-41, 2005.
 49. Sydiskis R.J., Owen D.G., Lohr J.L., Rosler K.H., Blomster R.N. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 2463-6, 1991.
 50. Di Renzo M., Sbrano P., De Aloe G., Pasqui A.L., Rubegni P., Ghezzi A., Auteri A., Fimiani M. Extracorporeal photopheresis affects co-stimulatory molecule expression and interleukin-10 production by dendritic cells in graft-versus-host disease patients. *Clin. Exp. Immunol.* 151, 407-13, 2008.
 51. Habeeb F., Shakir E., Bradbury F., Cameron P., Taravati M.R., Drummond A.J., Gray A.I., Ferro V.A. Screening methods used to determine the anti-microbial properties of Aloe vera inner gel. *Methods* 42, 315-320, 2007.
 52. Lanski S.L., Greenwald M., Perkins A., Simon H.K. Herbal therapy use in a pediatric emergency department population: expect the unexpected. *Pediatrics* 111, 981-5, 2003.
 53. Gupta A., Upadhyay N.K., Sawhney R.C., Kumar R. A poly-herbal formulation accelerates normal and impaired diabetic wound healing. *Wound Repair Regen.* 16, 784-90, 2008.
 54. Davis R. *The Conductor- Orchestra Concept of Aloe Vera.* (χ.χ.) (Ανακτήθηκε 23/07/2013). Διαθέσιμο στο δικτυακό τόπο: <http://www.aloevera-usa.com/docs/ConductOrch.pdf>
 55. Lin C.W., Wu C.F., Hsiao N.W., Chang C.Y., Li S.W., Wan L., Lin Y.J., Lin W.Y. Aloe-emodin is an interferon-inducing agent with antiviral activity against Japanese encephalitis virus and enterovirus 71. *Int. J. Antimicrob. Agents* 32, 355-9, 2008.
 56. Andersen D.O., Weber N.D., Wood S.G., Hughes B.G., Murray B.K., North J.A. In vitro virucidal activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivatives. *Antiviral Res.* 16, 185-96, 1991.
 57. George D., Bhat S.S., Antony B. Comparative evaluation of the antimicrobial efficacy of aloe vera tooth gel and two popular commercial toothpastes: An in vitro study. *Gen. Dent.* 57, 238-41, 2009.
 58. Beppu H., Shimpo K., Chihara T., Kaneko T., Tamai I., Yamaji S., Ozaki S., Kuzuya H., Sonoda, S. Antidiabetic effects of dietary administration of Aloe arborescens Miller components on multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice: investigation on hypoglycemic action and systemic absorption dynamics of aloe components. *J. Ethnopharmacol.* 103, 468-77, 2006.
 59. Willems M., van Buuren H.R., de Krijger R. Anthranoid self-medication causing rapid development of melanosis coli. *Neth. J Med.* 61, 22-4, 2003.
 60. Dat A.D., Poon F., Pham K.B., Doust J. Aloe vera for treating acute and chronic wounds. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2, CD008762, 2012.

March 16-19, 2014
Oegstgeest (near Leiden), The Netherlands

**EFMC Short Course on Medicinal Chemistry:
Engineering of Biopharmaceuticals**

Info: www.efmcshortcourses.org
e-mail: Koen.Augustyns@efmc.info

Organised by:

Henk TIMMERMAN,
VU University Amsterdam, NL
Koen AUGUSTYNS
EFMC Secretary
Course Organisers
Jesper LAU, Novo Nordisk, DK

* * *

April 10-13, 2014
Corfu, Greece

**1st World Congress on Geriatrics and
Neurodegenerative Disease Research**

Info: www.genedis.eu
Contact : info@genedis.eu

* * *

April 13-16, 2014
Melbourne, Australia

**5th FIP Pharmaceutical Sciences
World Congress (PSWC)**

E-mail: pswc@fip.org

* * *

May 18-22, 2014
Limassol, Cyprus

**32nd Cyprus-Noordwijkerhout-Camerino
Symposium-Trends in Drug Research**

Contact Person: Evsevios Hadjicostas
Tel: +357 224 66 500, Fax: +357 225 60 260
Email: info@quintessence.com.cy

* * *

May 23-25, 2014
Athens, Greece

**8th Congress of the Society
for Basic and Clinical Pharmacology.**

Info: <http://gsp.med.auth.gr>
e-mail: info@bioacademy.gr

* * *

June 23-25
Liege, Belgium

DRUG ANALYSIS 2014

Info: www.druganalysis.org
www.pba2014.org

* * *

August 31-September 4, 2014
St. Petersburg, Russia.

**20th EuroQSAR
Understanding Chemical-
Biological Interactions**

Info: www.euroqsar2014.org

* * *

September 7-11, 2014
Lisbon, Portugal.

**XXIII International Symposium
on Medicinal Chemistry.**

Info: www.efmc-ismc.org

* * *

November 13-15, 2014
Royal Olympic Hotel Athens, Greece.

Organizers: Hellenic Pharmaceutical Society,
Hellenic Society of Medicinal Chemistry,
International Liposome Society

Contact Person: Mrs. Irene Katti, tel.: 0030 211 100
1783, i.ka@zita-congress.gr

* * *

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
ΕΜΜ. ΜΠΕΝΑΚΗ 30/ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ



HELLENIC PHARMACEUTICAL SOCIETY
Head office: 30 EMM. BENAKIS STREET

Στο πλαίσιο των σκοπών της Ελληνικής Φαρμακευτικής Εταιρείας (Ε.Φ.Ε.), το Διοικητικό Συμβούλιο αποφάσισε, σε συνεργασία με τους τοπικούς Φαρμακευτικούς συλλόγους, σειρά Επιμορφωτικών Ημερίδων για Φαρμακοποιούς, σε διάφορες πόλεις της Ελλάδας.

Σκοπός των Ημερίδων αυτών, είναι η συνεχής ενημέρωση και επιμόρφωση όλων των Μελών της Ε.Φ.Ε., καθώς και **όλων των Φαρμακοποιών**, για την πρόοδο και τα επιτεύγματα στον Τομέα της Επιστήμης του Φαρμάκου.

Τις Ημερίδες θα παρακολουθούν, ελεύθερα, εκτός, από τα Μέλη της Ε.Φ.Ε., όλοι οι Φαρμακοποιοί και άλλοι επιστήμονες οι οποίοι ενδιαφέρονται για το «Φάρμακο».

Στα Μέλη της Ε.Φ.Ε. θα χορηγείται Πιστοποιητικό Παρακολούθησης.

Το πρόγραμμα των ενημερωτικών σεμιναρίων μέχρι στιγμής όπως έχει διαμορφωθεί ως εξής:

- Κυριακή, 23/2/2014, Φαρμακευτικός Σύλλογος Αρκαδίας.
- Κυριακή, 9/3/2014, Φαρμακευτικός Σύλλογος Ροδόπης,
- Κυριακή, 16/3/2014, Φαρμακευτικός Σύλλογος Αργολίδας,
- Κυριακή, 30/3/2014, Φαρμακευτικός Σύλλογος Κορινθίας,
- Κυριακή, 6/4/2014, Φαρμακευτικός Σύλλογος Καστοριάς,
- Κυριακή 27/4/2014, Φαρμακευτικός Σύλλογος Λέσβου,
- Κυριακή 11/5/2014, Φαρμακευτικός Σύλλογος Έβρου,
- Σάββατο 17/5/2014, Φαρμακευτικός Σύλλογος Τρικάλων,
- Σάββατο, 24/5/2014, Φαρμακευτικός Σύλλογος Μαγνησίας.

Θα καλυφθούν θέματα, τα οποία διαμορφώθηκαν σύμφωνα με τις ανάγκες που εξέφρασαν οι φαρμακοποιοί, όπως:

1. Γενόσημα φάρμακα,
2. Φαρμακοεπαγρύπνηση,
3. Καινοτόμα Φάρμακα,
4. Σακχαρώδης Διαβήτης,
5. Μητρικός Θηλασμός,
6. Διακοπή Καπνίσματος.

Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τις ώρες και τον ακριβή τόπο διεξαγωγής, τη Θεματολογία και το πλήρες πρόγραμμα, επικοινωνήστε μαζί μας, καθώς διαφοροποιούνται ανάλογα με τον Φαρμακευτικό Σύλλογο.

Τηλέφωνο Επικοινωνίας: 211 100 1774, e-mail: f.tz@zita-congress.gr

Ο Πρόεδρος

Καθηγητής Κωνσταντίνος Δεμέτζος

Η Γραμματέας

Καθηγήτρια Ιωάννα Χίνου

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Διευθ. Επικοινων.: Τμήμα Φαρμακευτικής
Πανεπιστημίου Αθηνών
Πανεπιστημιόπολη, 15771 Αθήνα
Τηλ.: (210) 7274596 - Fax: (210) 7274027

HELLENIC PHARMACEUTICAL SOCIETY
Mailing Add.: Dept. of Pharmacy
University of Athens
Panepistimiopolis, 15771 Athens, Greece
Tel: (+30 210), 7274596 - Fax: (+30 210) 7274027

<http://www.effe.org.gr/>

www.drugdiscoverytodelivery2014.com



Ist International Congress:

from drug discovery
to drug delivery

Chair of the Congress:

Prof. Gregory Gregoriadis

Co-chairs:

Prof. Costas Demetzos

Prof: A. Tsantili-Kakoulidou

**13-15
November
2014**

Royal Olympic Hotel
Athens, Greece

Organizers:



Hellenic Pharmaceutical Society



Hellenic Society of Medicinal Chemistry



International Liposome Society

Organizational Support



Contact: Mrs. Irene Katti,
tel. 0030 211 1001783,
i.ka@zita-congress.gr



30 years of excellence, inspiration, efficiency
Congresses & Events / Travels / Associations



ISO 9001
ISO 14001

We inspire results

1st klm Peanias-Markopoulou Avenue, 19002, Peania, T: +30 211 1001 777, F: +30 210 6642 116

info@zita-congress.gr, www.zita-congress.gr

Εκφραστείτε ελεύθερα!

Συστήματα μέτρησης
γλυκόζης του αίματος.



Για τον έλεγχο
του διαβήτη

- Αυτόματη κωδικοποίηση
- Άμεση μέτρηση σε 5 δευτερόλεπτα
- Μνήμη 500 μετρήσεων με ημερομηνία & ώρα
- Αυτόματος υπολογισμός μέσου όρου 1,7, 14, 30, 90 ημερών
- Φωτιζόμενη οθόνη
- Θύρα USB για μεταφορά δεδομένων σε Η/Υ



BIONIME



KARABINIS MEDICAL

ΑΠΟΚΛΕΙΣΤΙΚΟΣ ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΥΠΡΟ: **KARABINIS MEDICAL SA** • Λ. ΛΑΥΡΙΟΥ 151, ΠΑΙΑΝΙΑ 190 02 ΑΘΗΝΑ
ΤΗΛ: 210 66.45.751, 210 66.45.837, FAX: 210 66.46.000 • WEB SITE: www.karabinismedical.gr • EMAIL: info@karabinismedical.gr
www.hypertensiondiabetescorner.gr.com



www.facebook.com/KarabinisMedical

transit ELUSANES

Συμπλήρωμα διατροφής
Ακακία-Δαμάσκηνο-Οξυφόνικας
(tamarin)
100% φυσικής προέλευσης

URISANOL gelules

Συμπλήρωμα διατροφής
Cranberry
36 mg προανθοκυανιδινών



› Δύο νέα προϊόντα

από την



Pierre Fabre
FARMAKA S.A.

Για πληροφορίες επικοινωνήστε με την εταιρία
Τηλ.: 210 72 34 582

