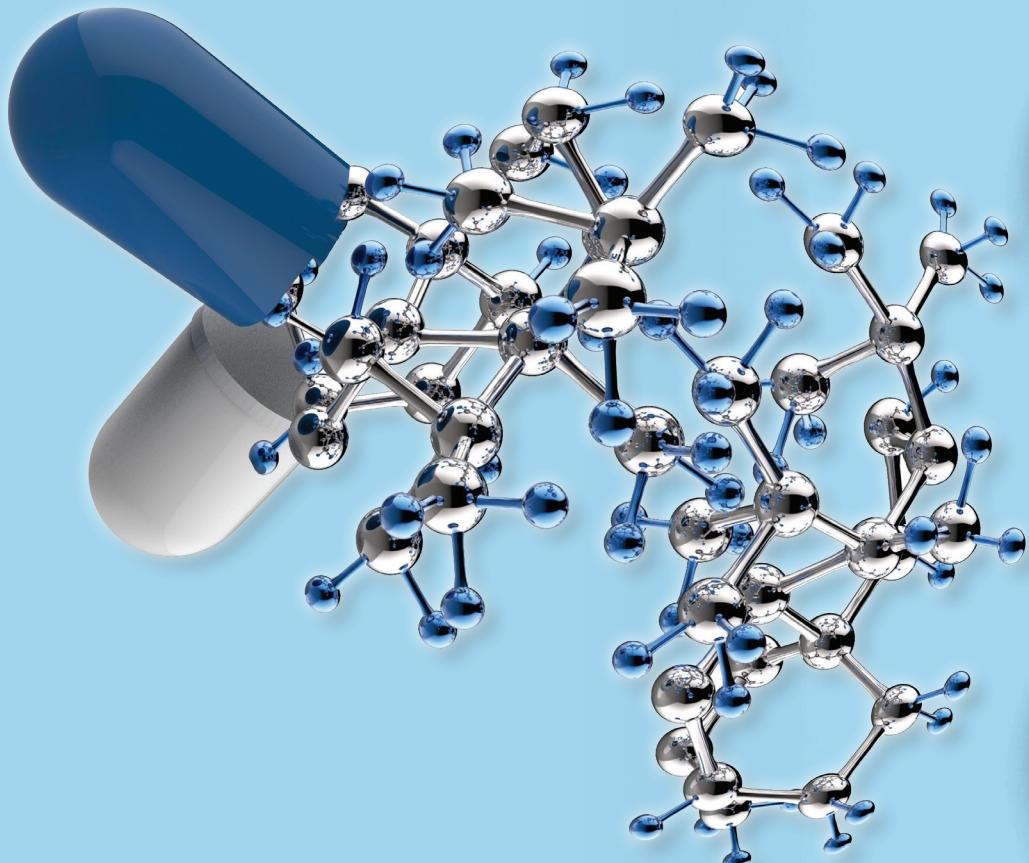




ISSN 1105-4999

# ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ PHARMAKEFTIKI

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



ΤΟΜΟΣ  
VOLUME 35 • ΤΕΥΧΟΣ  
ISSUE III

ΙΟΥΛΙΟΣ - ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2023  
JULY - SEPTEMBER 2023

## ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΜΕ ΘΕΜΑΤΑ  
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΟΜΟΣ 35, ΤΕΥΧΟΣ III,  
ΙΟΥΛΙΟΣ - ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2023  
**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ**

### A. Τσαντίλη

Ομοτ. Καθηγήτρια, Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ)  
tsantili@pharm.uoa.gr

### ΑΡΧΙΣΥΝΤΑΚΤΗΣ

#### Γ.Α. Καρίκας

Ομότιμος καθηγητής, Πανεπιστήμιο  
Δυτικής Αττικής, karikasg@uniwa.gr

### ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

#### Κ. Δεμέτζος

Καθηγητής, ΕΚΠΑ

#### Β. Δημόπουλος

Ομοτ. Καθηγητής, ΑΠΘ

#### N. Κόλμαν

Galenica SA

#### X. Κοντογιώργης,

Επ. Καθηγητής, Δ.Π.Θ.

#### Π. Κουρουνάκης

Ομοτ. Καθηγητής,

Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, ΑΠΘ

#### Π. Μαχαίρας

Ομοτ. Καθηγητής, ΕΚΠΑ

#### Σ. Νικολαρόπουλος

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

#### Γ. Πάιρας

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

#### Ε. Παντερή

Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ

#### Α. Πελετίδη

Πανεπιστήμιο Λευκωσίας, Κύπρος

#### Δ. Ρέκκας

Αναπλ. Καθηγητής, ΕΚΠΑ

## PHARMAKEFTIKI

A QUARTERLY EDITION  
ON PHARMACEUTICAL SCIENCES' TOPICS  
VOLUME 35, ISSUE III,  
JULY - SEPTEMBER 2023

### EDITOR

#### A. Tsantili

Emeritus Professor, National and Kapodistrian  
University of Athens (NKUA)  
tsantili@pharm.uoa.gr

### CO EDITOR

#### G.A. Karikas

Emeritus professor, University of West Attica,  
Greece, karikasg@uniwa.gr

### EDITORIAL BOARD

#### C. Demetzos

Professor, NKUA

#### V.J. Demopoulos

Emeritus Professor, AUTH

#### N. Kolman

Galenica SA

#### Ch. Kontogiorgis

Assistant Professor, D.U.Th.

#### P. Kourounakis

Emeritus Professor,

University of Thessaloniki, AUTH

#### P. Macheras

Emeritus Professor, NKUA

#### S. Nikolaropoulos

Professor, University of Patras

#### G. Pairas

Associate Professor, University of Patras

#### I. Panderi

Professor, NKUA

#### A. Peletidi

University of Nicosia, Cyprus.

#### D. Rekkas

Associate Professor, NKUA

Οδηγίες προς συγγραφείς/Authors guidelines: <https://www.hsmc.gr/author-guidelines/>

#### E-mail για υποβολή εργασιών:

tsantili@pharm.uoa.gr, karikasg@uniwa.gr

Για την ηλεκτρονική έκδοση της «Φαρμακευτικής»  
και οδηγίες προς συγγραφείς  
επισκεφτείτε την διεύθυνση: [www.hsmc.gr](http://www.hsmc.gr)

Τα άρθρα που δημοσιεύονται  
στην «Φαρμακευτική» καταχωρούνται  
στα Chemicals Abstracts, EMBASE,  
SCOPUS και EBSCO

#### E-mail for manuscript submission:

tsantili@pharm.uoa.gr, karikasg@uniwa.gr

For "Pharmakeftiki" electronic edition  
and instructions to authors  
please visit [www.hsmc.gr](http://www.hsmc.gr)

Articles published in "Pharmakeftiki"  
are indexed in Chemical Abstracts,  
EMBASE, SCOPUS and EBSCO

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ / CONTENTS

**Βιολογικές δοκιμασίες για τον προκλινικό έλεγχο νέων μορίων με αντικαρκινική δραστικότητα: το παράδειγμα ημισυνθετικών αναλόγων της ολευρωπεΐνης**  
Ευαγγελία Νίκου, Νικόλαος Αγγέλης, Οδυσσεύς Λιάγκας,  
Παναγιώτα Παπακότση,  
Γεωργία Σαρικάκη, Ευθύμιος Παράνης, Νικόλας Ωρολογάς-  
Σταύρου, Ιωάννης Κωστόπουλος, Παντελής Ρουσάκης,  
Χρυσάνθη Παντελή, Γεωργία Δημητρακοπούλου,  
Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης, Ιωάννης Κ. Κωστάκης,  
Ουρανία Τσιτσιλώνη ..... 2-27

**Role of Vitamins and Minerals in Treating Certain Health Conditions: A Review of Current Opinion**  
Girija S. Singh ..... 28-37

**Evaluating Cypriot pharmacist's knowledge of alcohol-medication interactions**  
Glykeria Panayidou, Periklis Charalampous, Michael Petrides  
and Aliki Peletidi ..... 38-47

**Mupirocin-Loaded Niosomal Gel for Topical Wound Healing Application**  
Srikrishna Theerdhala, Narayanaswamy Harikrishnan ..... 48-61

**In memorial** ..... 62-63

**Εκδηλώσεις** ..... 64

**Biological assays for the preclinical evaluation of new molecules with anticancer activity: the example of semisynthetic analogues of oleuropein**  
Evangelia Nikou, Nikolaos Angelis, Odyssefs Liagkas,  
Panagiota Papakotsi, Georgia Sarikaki, Eftimios Paronis,  
Nikolas Orolugas-Stavrou, Ioannis Kostopoulos, Pantelis  
Rousakis, Chrysanthi Panteli, Georgia Dimitrakopoulou,  
Alexios-Leandros Skaltsounis, Ioannis K. Kostakis, Ourania  
Tsitsilonis ..... 2-27

**Role of Vitamins and Minerals in Treating Certain Health Conditions: A Review of Current Opinion**  
Girija S. Singh ..... 28-37

**Evaluating Cypriot pharmacist's knowledge of alcohol-medication interactions**  
Glykeria Panayidou, Periklis Charalampous, Michael Petrides  
and Aliki Peletidi ..... 38-47

**Mupirocin-Loaded Niosomal Gel for Topical Wound Healing Application**  
Srikrishna Theerdhala, Narayanaswamy Harikrishnan ..... 48-61

**In memorial** ..... 62-63

**Meetings** ..... 64

## ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ  
ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΧΗΜΕΙΑΣ  
& ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

## PHARMAKEFTIKI

A QUARTERLY JOINT EDITION OF  
THE HELLENIC SOCIETY OF  
MEDICINAL CHEMISTRY &  
THE HELLENIC PHARMACEUTICAL SOCIETY



ZITA MEDICAL MANAGEMENT, Ομήρου 29A, Πέτα Σαρωνικού, Ελλάδα  
Τηλ.: + 30 22994 40962, E-mail: g.kouloumpis@zitamanagement.com



# Βιολογικές Δοκιμασίες για τον Προκλινικό Ελεγχο Νέων Μορίων με Αντικαρκινική Δραστικότητα: το Παράδειγμα Ημισυνθετικών Αναλόγων της Ολευρωπεΐνης

Ευαγγελία Νίκου<sup>1\*</sup>, Νικόλαος Αγγέλης<sup>1</sup>, Οδυσσεύς Λιάγκας<sup>1</sup>, Παναγιώτα Παπακότση<sup>2</sup>, Γεωργία Σαρικάκη<sup>2</sup>, Ευθύμιος Παρώνης<sup>1</sup>, Νικόλαος Ωρολογάς-Σταύρου<sup>1</sup>, Ιωάννης Κωστόπουλος<sup>1</sup>, Παντελής Ρουσάκης<sup>1</sup>, Χρυσάνθη Παντελή<sup>1</sup>, Γεωργία Δημητρακοπούλου<sup>1</sup>, Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης<sup>2</sup>, Ιωάννης Κ. Κωστάκης<sup>3\*</sup>, Ουρανία Τσιτσιλώνη<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Μονάδα Κυτταρομετρίας Ροής, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, <sup>2</sup>Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής και <sup>3</sup>Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη, 15784, Ιλίσια, Αθήνα, Ελλάδα

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:**  
ανάπτυξη νέων φαρμάκων; αντικαρκινική δράση; *in silico* έλεγχος; *in vitro* έλεγχος; *in vivo* έλεγχος

**ARTICLE INFO:**  
Received: May 22, 2023  
Accepted: May 30, 2023  
Available on line: July, 28, 2023

**ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ ΓΙΑ ΑΛΛΗΛΟΓΡΑΦΙΑ:**  
Ευαγγελία Νίκου  
eunikou@med.uoa.gr,  
Ιωάννης Κωστάκης  
ikkostakis@pharm.uoa.gr,  
Ουρανία Τσιτσιλώνη  
rtsitsil@biol.uoa.gr

## ABSTRACT

Η τοξικότητα και η περιορισμένη αποτελεσματικότητα πολλών παραδοσιακών χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων καθιστούν επιτακτική την ανάγκη ανεύρεσης νέων στόχων και την ανάπτυξη νέων φαρμάκων για τη θεραπεία του καρκίνου. Η ανάπτυξη νέων φαρμάκων με αντικαρκινική δραστικότητα αποτελεί μια επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία και απαιτεί το συνδυασμό μιας πληθώρας *in silico*, *in vitro*, και *in vivo* τεχνικών και κλινικών δοκιμών. Η ραγδαία ανάπτυξη της πληροφορικής παρέχει τρομερές δυνατότητες και τα *in silico* προγράμματα χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανακάλυψη νέων στόχων. Παράλληλα, με τις *in vitro* δοκιμασίες αξιολογούνται οι αλληλεπιδράσεις των πιθανών φαρμακευτικών ουσιών σε κυτταρικά συστήματα. Στο τελευταίο στάδιο του προκλινικού έλεγχου που αφορά τα *in vivo* μοντέλα, μελετάται η φαρμακοκινητική, η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα των υποψήφιων μορίων σε πειραματόζωα. Η συγκεκριμένη ανασκόπηση αποσκοπεί να παρουσιάσει μια σειρά από *in silico*, *in vitro* και *in vivo* τεχνικές που χρησιμοποιούνται στον προκλινικό έλεγχο για την αξιολόγηση της αντικαρκινικής δράσης ουσιών. Παρουσιάζονται οι πιο συνηθισμένες *in silico* προσεγγίσεις, καθώς και *in vitro* τεχνικές για τον έλεγχο της δραστικότητας των ουσιών, τον επαγόμενο τύπο κυτταρικού θανάτου, το βαθμό μεταβολής του κυτταρικού διπλασιασμού και των αλλαγών στον κυτταρικό κύκλο, κάποια *in vivo* μοντέλα για

τον έλεγχο της ανάπτυξης του όγκου, αλλά και η αξιολόγηση της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος *ex vivo*. Τέλος, παρουσιάζεται επιγραμματικά η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται στη Μονάδα Κυτταρομετρίας Ροής του Τμήματος Βιολογίας σε συνεργασία με το Τμήμα Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ για την αξιολόγηση της αντικαρκινικής δράσης ενός νέου αναλόγου της ολευρωπεΐνης, παραθέτοντας ορισμένα αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα.

## 1. Εισαγωγή

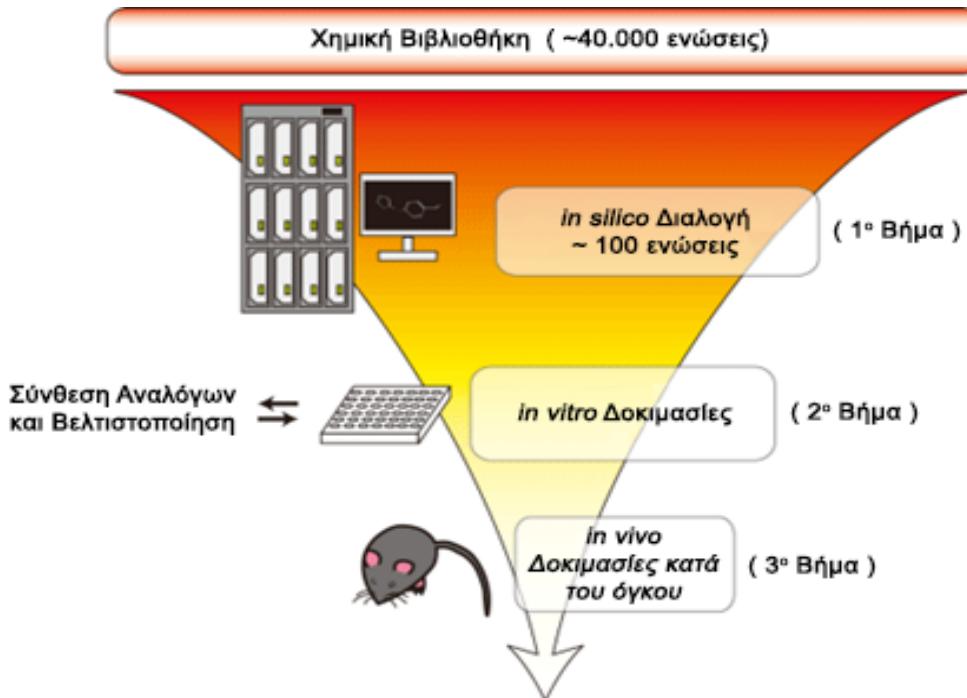
Παρόλη τη σημαντική πρόοδο στην αντιμετώπιση και διαχείριση των νεοπλασιών τις τελευταίες τρεις δεκαετίες<sup>1</sup>, ο καρκίνος αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως<sup>2</sup>. Ο Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC) υπολογίζει ότι μέχρι το 2040 θα έχουν προκύψει παγκοσμίως 30,2 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου και 16,3 εκατομμύρια νέοι θάνατοι<sup>3</sup>. Ο καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα, του τραχήλου της μήτρας και του θυρεοειδούς είναι οι πιο συχνοί τύποι καρκίνου που εμφανίζονται στις γυναίκες, ενώ ο καρκίνος του προστάτη, του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, της ουροδόχου κύστης και το μελάνωμα είναι οι πιο συχνά εμφανιζόμενοι στους άντρες<sup>4</sup>.

Οι θεραπείες που εφαρμόζονται διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου και το στάδιο της νόσου και περιλαμβάνουν τη χειρουργική εκτομή του όγκου, τη χημειοθεραπεία, την ακτινοθερα-

πεία, την ορμονοθεραπεία, την ανοσοθεραπεία, καθώς και άλλες στοχευμένες θεραπείες. Οι καρκίνοι που διαγιγνώσκονται σε αρχικό στάδιο συνήθως είναι πιο εύκολα διαχειρίσιμοι, όμως ο μεταστατικός καρκίνος είναι πολύ δύσκολο να αντιμετωπιστεί με τις κλασικές θεραπείες<sup>5</sup>. Η διαδικασία για την ανάπτυξη νέων αποτελεσματικών φαρμάκων είναι επίπονη, χρονοβόρα και ιδιαίτερα ακριβή. Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τον προκλινικό έλεγχο μέχρι να διατεθεί ένα συγκεκριμένο φάρμακο στην αγορά μπορεί να διαρκέσει 10-17 χρόνια και το συνολικό κόστος να κυμανθεί μεταξύ 2-3 δισεκατομμυρίων δολαρίων<sup>6,7</sup> (Εικόνα 1). Έχει υπολογιστεί ότι για κάθε 5.000 ουσίες που ελέγχονται προκλινικά, μόνο μία ή δύο θα λάβουν τελική έγκριση για κλινική χρήση<sup>8</sup>. Μέσα στις τελευταίες έξι δεκαετίες έχει ανακαλυφθεί ένας πολύ μεγάλος αριθμός αντικαρκινικών φαρμάκων, πολλά από τα οποία όμως δεν έχουν καταφέρει να εκπληρώσουν τις προσδοκίες των ερευνητών σε κλινικό επίπεδο,



**Εικόνα 1.** Το χρονικό διάστημα και τα κύρια στάδια της διαδικασίας ανάπτυξης νέων αντικαρκινικών φαρμάκων. Απαιτούνται 10-17 χρόνια για τη βασική έρευνα, το σχεδιασμό, τα *in vitro* και *in vivo* πειράματα (συμπεριλαμβανομένων των ελέγχων ασφάλειας και αποτελεσματικότητας), τις κλινικές δοκιμές και τέλος την έγκριση και κυκλοφορία του νέου φαρμάκου στην αγορά (Προσαρμοσμένο από την παραπομπή<sup>10</sup>).



Εικόνα 2. Διάγραμμα ροής προκλινικού ελέγχου. Από μία χημική βιβλιοθήκη που μπορεί να περιλαμβάνει αρκετές χιλιάδες ενώσεις, γίνεται *in silico* διαλογή ώστε να επιλεγούν λίγες δεκάδες (1<sup>o</sup> Βήμα). Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται *in vitro* δοκιμασίες φαρμακολογικής σάρωσης για να ελεγχθεί η κυτταροτοξικότητα των ουσιών και επιπλέον, οι αλληλεπιδράσεις τους με τα κύτταρα (2<sup>o</sup> Βήμα). Οι λίγες ουσίες που ικανοποιούν τα κριτήρια ελέγχονται σε *in vivo* μοντέλα όγκων σε πειραματόζωα (3<sup>o</sup> Βήμα) (Προσαρμοσμένο από την παραπομπή<sup>15</sup>).

καθώς προκαλούν αρκετές παρενέργειες ή δεν είναι τόσο αποτελεσματικά στον άνθρωπο<sup>9</sup>. Συνεπώς, η αναζήτηση για την ανάπτυξη καινοτόμων, αποτελεσματικών και προσιτών αντικαρκινικών φαρμάκων παραμένει μια πρόκληση.

Στο πλαίσιο αυτής της ζήτησης, τα τελευταία χρόνια τα φυσικά προϊόντα και τα ανάλογά τους έχουν συγκεντρώσει το επιστημονικό ενδιαφέρον για τις πιθανές αντικαρκινικές θεραπευτικές τους ιδιότητες. Περίπου το 60% των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται αυτή τη στιγμή για τη θεραπεία του καρκίνου είναι τροποποιημένα φυσικά προϊόντα<sup>11</sup>, απομονωμένα κυρίως από φυτά. Η πακλιταζέλη, η βινκριστίνη και η δοξορούμβικίνη είναι χαρακτηριστικά παραδείγματα γνωστών αντικαρκινικών φαρμάκων που προέρχονται από φυσικά προϊόντα<sup>12</sup>.

Συχνά, οι επιστήμονες που ασχολούνται με την ανακάλυψη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων συνθέτουν σειρές μορίων (χημικές βιβλιοθήκες) με διαφορετική δομή μεταξύ τους, βασιζόμενοι σε υπολογιστικά προγράμματα σχεδιασμού φαρμάκων (*in silico* drug design), στην πρωτεΐνική δομή του μορίου-στόχου (συνήθως ένας υποδοχέας), και στις φυσικοχημικές ιδιότητες και τη χημική δομή των ομάδων που προστίθενται στο αρχικό ικρίωμα. Στη συνέχεια, ακολουθεί η διαδικασία της φαρμακολογικής σάρωσης *in vitro*, που εστιάζει στην ανάδειξη νέων μορίων με αυξημένη κυτταροτοξικότητα έναντι καρκινικών κυττάρων. Όσο μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα έχει ένα μόριο, και ειδικά αν είναι κοντά ή παρόμοια με την αντίστοιχη του θετικού μάρτυρα, τόσο πιο δραστικό θεωρείται<sup>13,14</sup>. Τη διαλογή αυτή ακολουθεί περαιτέρω ανάλυση σε *in vitro*

κυτταρικά συστήματα, όπου τα πειράματα εστιάζουν στην αλληλεπίδραση του νέου μορίου με τα κύτταρα. Και αυτό γιατί η ικανοποιητική κυτταροτοξικότητα δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας που καθιστά μια νέα ουσία ένα δυνητικά υποσχόμενο αντικαρκινικό φάρμακο. Απαιτούνται συμπληρωματικά *in vitro* πειράματα ώστε να ελεγχθεί, για παράδειγμα, η κυτταροτοξικότητά της και έναντι φυσιολογικών, μη καρκινικών κυττάρων, η πιθανή κυτταροστατική της δραστικότητα και ο επαγόμενος τύπος κυτταρικού θανάτου. Στο τελικό στάδιο του προκλινικού ελέγχου, η δραστική ουσία ελέγχεται σε *in vivo* μοντέλα όγκων σε πειραματόζωα (συνήθως σε ποντικούς ή αρουραίους), στα οποία μελετάται κυρίως η φαρμακοκινητική της σε ένα ζωντανό οργανισμό, εστιάζοντας στο μεταβολισμό, την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητά της (Εικόνα 2).

Συνολικά, εφόσον τα αποτελέσματα στα κυτταρικά συστήματα είναι ενθαρρυντικά και η αποτελεσματικότητα επιβεβαιώθει και *in vivo*, τότε πιθανά η συγκεκριμένη ουσία να έχει φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Στην ανασκόπηση αυτή, θα αναφερθούμε στα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα προκλινικά (*in silico*, *in vitro* και *in vivo*) πειραματικά μοντέλα για την αξιολόγηση νέων αντικαρκινικών μορίων και, στο τέλος, θα παραθέσουμε ένα ενδεικτικό παράδειγμα από τη ροή των πειραμάτων ελέγχου της αντικαρκινικής δραστικότητας ενός νέου ημισυνθετικού αναλόγου της ολευρωπεΐνης.

## 2. *In silico* προσεγγίσεις για την ανάλυση νέων αντικαρκινικών μορίων

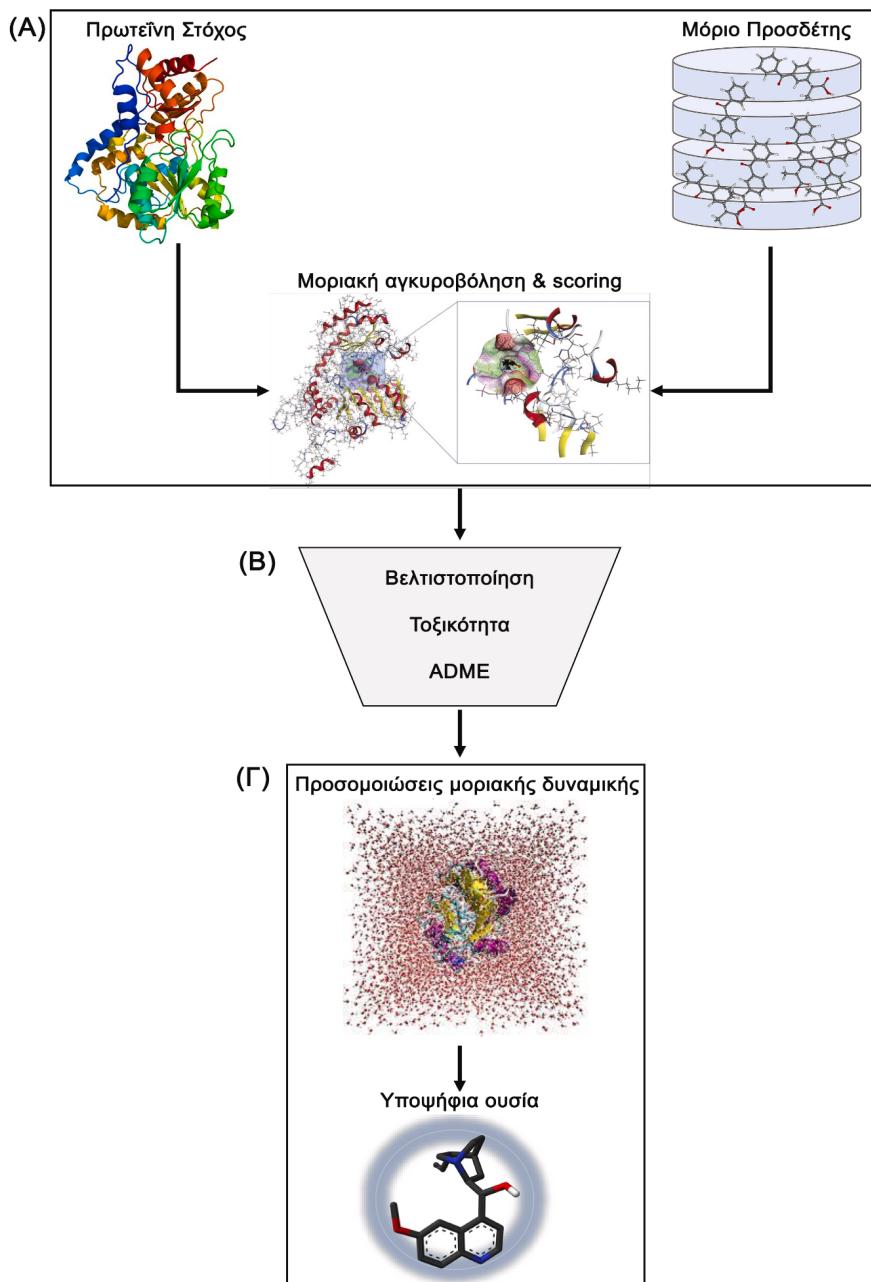
Η επανάσταση που έχει προκληθεί στους τομείς της βιολογίας, χημείας, αλλά και της πληροφορικής μέσω της τεχνητής νοημοσύνης, έχει δημιουργήσει νέες προοπτικές και δυνατότητες στη διαδικασία της ανάπτυξης φαρμάκων. Οι *in silico* τεχνικές είναι μέθοδοι μοριακού σχεδιασμού με χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων και βασίζονται σε αρχές και μεθόδους της κβαντικής χημείας. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, έχουν δημιουργηθεί δεδομένα μεγάλης κλίμακας για πάνω από 1 εκατομμύριο χημικά μόρια<sup>16</sup>, τα οποία έχουν συγκεντρω-

θεί σε βάσεις δεδομένων χημικών βιβλιοθηκών. Συνεπώς, η χρήση των *in silico* τεχνικών έχει γίνει απαραίτητη στη διαδικασία της ανάπτυξης νέων φαρμάκων, με αποτέλεσμα να βρισκόμαστε πλέον στην εποχή του Ορθολογικού Σχεδιασμού Φαρμάκων (Rational Drug Design) ή της Ανακάλυψης Φαρμάκων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή (Computer-aided Drug Discovery, CADD). Μέσω της CADD μπορεί να επιτευχθεί υπολογιστική ταυτοποίηση πιθανών φαρμακευτικών στόχων, εικονική σάρωση από τις μεγάλες χημικές βιβλιοθήκες για πιθανά υποψήφια φάρμακα, βελτιστοποίηση των υποψήφιων μορίων, καθώς και *in silico* αξιολόγηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων και της τοξικότητάς τους. Με αυτόν τον τρόπο, μειώνεται ο αριθμός των χημικών μορίων που θα αξιολογηθούν στη συνέχεια πειραματικά και, παράλληλα, αυξάνεται το ποσοστό επιτυχίας στις μετέπειτα κλινικές δοκιμές, καθώς αποκλείονται από τον έλεγχο τα μη αποτελεσματικά και τοξικά παράγωγα<sup>17</sup>.

Στην CADD υπάρχουν 2 προσεγγίσεις: η ανακάλυψη νέων φαρμάκων βασισμένων στη δομή τους (Structure-based Drug Discovery, SBDD)<sup>18</sup> (Εικόνα 3) και βασισμένων στον προσδέτη τους (Ligand-based Drug Discovery, LBDD)<sup>19</sup>. Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής εξαρτάται από το αν είναι διαθέσιμη ή όχι η τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης-στόχου. Η χρήση της προσέγγισης SBDD στηρίζεται στη γνώση της δομής της πρωτεΐνης-στόχου, η οποία μπορεί να προκύψει πειραματικά ή μέσω *in silico* μεθόδων όπως η μοντελοποίηση ομολογίας (homology modeling). Αντίθετα, όταν η δομή δεν είναι γνωστή, χρησιμοποιείται συχνά ως εναλλακτική η προσέγγιση LBDD.

Οι πρωτεΐνες-στόχοι μπορούν να προκύψουν υπολογιστικά μέσα από πειραματικά δεδομένα<sup>20, 21</sup> ή να εξαχθούν από πρωτεΐνικά δίκτυα<sup>22</sup> ή μέσω αναζήτησης καταγραφών από τη βιβλιογραφία (text mining)<sup>23</sup>. Υπάρχουν ορισμένοι διακομιστές (servers) όπως το Harmonizome<sup>24</sup> και το Open Targets Platform<sup>25</sup>, που προσφέρουν σειρές πιθανών φαρμακευτικών στόχων οι οποίες προκύπτουν χρησιμοποιώντας διάφορες βάσεις δεδομένων, όπως είναι η ChEMBL και η DrugBank<sup>26</sup>.

Εκτός από το χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης-στό-



Εικόνα 3. Διάγραμμα ροής της διαδικασίας ανακάλυψης νέων φαρμάκων βασισμένων στη δομή (Structure-based Drug Discovery, SBDD). **(Α)** Πραγματοποιείται έλεγχος της μοριακής αγκυροβόλησης μεταξύ του μορίου-προσδέτη και της πρωτεΐνης-στόχου και εντοπίζονται οι ουσίες με τις καλύτερες διαμορφώσεις με βάση τη συγγένεια σύνδεσης. **(Β)** Τα μόρια βελτιστοποιούνται με βάση τις φυσικοχημικές και φαρμακολογικές τους ιδιότητες και τον έλεγχο απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης (absorption, distribution, metabolism and excretion, ADME) και τοξικότητας. **(Γ)** Εφαρμόζονται επιπρόσθετες προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι διαμορφώσεις και τελικά, επιλέγονται τα υποψήφια μόρια τα οποία θα αξιολογηθούν στη συνέχεια πειραματικά (Προσαρμοσμένο από την παραπομπή<sup>33</sup>).

χου είναι σημαντικό να εντοπιστούν και οι προσδέτες της με αποτελεσματικές φαρμακοκινητικές ιδιότητες και χαμηλή κυτταροτοξικότητα. Ο συνδυασμός της μηχανικής μάθησης και των χημικών βιβλιοθηκών επιτρέπει τη δημιουργία υπολογιστικών μεθόδων προκειμένου να επιτευχθεί μια εικονική σάρωση ενός τεράστιου αριθμού χημικών μορίων και στη συνέχεια, να αξιολογηθούν γρήγορα και για τις υπόλοιπες ιδιότητές τους<sup>27,28</sup>.

Η προσέγγιση LBDD χρησιμοποιεί πρότερη γνώση από ήδη υπάρχοντα φάρμακα (όπως τα δομικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους) για να προβλέψει νέες ουσίες με παρόμοια βιολογικά χαρακτηριστικά<sup>29</sup>. Η πρόβλεψη βασίζεται στην ομοιότητα των χαρακτηριστικών (αρωματικότητα, υδροφοβικότητα, κατάλοιπα ανιόντων και κατιόντων) μεταξύ των χημικών μορίων, με βάση την υπόθεση ότι μόρια που έχουν έντονες δομικές και φυσικοχημικές ομοιότητες είναι πιο πιθανό να έχουν και παρόμοια βιολογική δραστικότητα<sup>29</sup>. Με βάση αυτήν την υπόθεση χρησιμοποιούνται μαθηματικά μοντέλα όπως τα μοντέλα ποσοτικής σχέσης δομής-δράσης (quantitative structure-activity relationship, QSAR). Για την εικονική σάρωση μπορούν να χρησιμοποιηθούν ένα πλήθος από χημικές βιβλιοθήκες οι οποίες είναι δημόσια διαθέσιμες, όπως είναι η PubChem<sup>30</sup>, και η Zinc15<sup>31</sup>.

Αντίθετα, η προσέγγιση SBDD υπολογίζει τη συγγένεια σύνδεσης μεταξύ ενός προσδέτη και της πρωτεΐνης-στόχου, χρησιμοποιώντας τις δομές του προσδέτη και της πρωτεΐνης-στόχου που είναι ήδη γνωστές<sup>32</sup> (Εικόνα 3). Η μέθοδος που εφαρμόζεται είναι η μοριακή αγκυροβόληση (molecular docking).

Οι μέθοδοι της αγκυροβόλησης χρησιμοποιούν μια διαδικασία βαθμολόγησης (scoring), στην οποία η κάθε διαφορετική διαμόρφωση πρωτεΐνης-προσδέτη παίρνει διαφορετικό βαθμό ανάλογα με την ενέργεια των αλληλεπιδράσεων. Οι αλγόριθμοι της μοριακής αγκυροβόλησης προβλέπουν το βέλτιστο προσανατολισμό του προσδέτη και υπολογίζουν τη συγγένεια των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και των δυνάμεων van der Waals<sup>34-37</sup>. Με τη μοριακή αγκυροβόληση, ένας τεράστιος αριθμός προσδετών μπορεί να σαρωθεί εικονικά και να βρεθούν εκείνοι με την υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης με την

πρωτεΐνη-στόχο. Ορισμένα παραδείγματα εργαλείων μοριακής αγκυροβόλησης είναι το DOCK<sup>38</sup> και το Glide<sup>39</sup>.

Παρόλα αυτά, οι περίπλοκες ατομικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών-στόχων και των προσδετών μπορούν να δημιουργήσουν ορισμένες ανακρίβειες οι οποίες πολλές φορές παρακάμπτονται με τη μοριακή δυναμική. Οι προσομοιώσεις της μοριακής δυναμικής παρέχουν μια καλύτερη κατανόηση όσον αφορά στα δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών και στη σταθερότητα των συνδέσεων πρωτεϊνών-προσδετών. Επίσης, βοηθούν στην ταυτοποίηση επιπλέον περιοχών πρόσδεσης, όπως για παράδειγμα αλλοστερικών θέσεων, και συνεπώς οδηγούν στο σχεδιασμό πιο αποτελεσματικών φαρμακευτικών ουσιών<sup>40,41</sup>.

Ένα επιπλέον βήμα στη διαδικασία είναι να αξιολογηθούν οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες των ουσιών, όπως με τον έλεγχο απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης (absorption, distribution, metabolism and excretion, ADME) και τοξικότητας. Τα φαρμακευτικά μόρια χρειάζεται να διαπεράσουν διάφορους φυσιολογικούς φραγμούς μέσα στο ανθρώπινο σώμα προκειμένου να φτάσουν στους βιολογικούς στόχους τους. Προβλήματα στη φαρμακοκινητική και η εμφάνιση τοξικότητας είναι υπεύθυνα για το 40-60% των αποτυχιών στα επόμενα στάδια<sup>42</sup>. Έχουν αναπτυχθεί πλήθος μοντέλων βασισμένων στη μηχανική μάθηση προκειμένου να προβλεφθεί το φαρμακοκινητικό προφίλ, όπως τα PreADMET<sup>43</sup> και SwissADME<sup>44</sup>, ώστε να προκύπτουν υποψήφια φάρμακα με υψηλή αποδοτικότητα και χαμηλή τοξικότητα.

### 3. Κυτταρικά μοντέλα για την *in vitro* ανάλυση νέων αντικαρκινικών μορίων

H *in silico* ανάλυση αποτελεί το πρώτο βήμα από το οποίο προκύπτουν δυνητικά τα πιο δραστικά μόρια. Στη συνέχεια, αυτά τα μόρια ελέγχονται *in vitro* σε κυτταρικά συστήματα προκειμένου να διαπιστωθεί, μεταξύ άλλων, η κυτταροτοξικότητά τους έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών και φυσιολογικών κυττάρων, ο τύπος του επαγόμενου κυτταρικού θανάτου και η κυτταροστατική τους δράση. Οι καρκινι-

**Πίνακας 1. Κατάλογος των ανθρώπινων καρκινικών σειρών που χρησιμοποιείται από το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου των ΗΠΑ**

Είδος Καρκίνου	Κυτταρική Σειρά
Λευχαιμία	CCRF-CEM, HL-60(TB), K-562, MOLT-4, RPMI-8226, SR, P388, P388/ADR
Μη Μικροκυτταρικός Πνεύμονα	A549/ATCC, EKVX, HOP-62, HOP-92, NCI-H226, NCI-H23, NCI-H322M, NCI-H460, NCI-H522, LXFL 529
Παχέος Εντέρου	COLO 205, HCC-2998, HCT-116, HCT-15, HT29, KM12, SW-620, DLD-1, KM20L2
Κεντρικού Νευρικού Συστήματος	SF-268, SF-295, SF-539, SNB-19, SNB-75, U251, SNB-78, XF 498
Μελάνωμα	LOX IMVI, MALME-3M, M14, MDA-MB-435, SK-MEL-2, SK-MEL-28, SK-MEL-5, UACC-257, UACC-62, RPMI-7951, M19-MEL
Ωοθηκών	IGR-OV1, OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-5, OVCAR-8, NCI/ADR-RES, SK-OV-3
Νεφρού	786-0, A498, ACHN, CAKI-1, RXF 393, SN12C, TK-10, UO-31, RXF-631, SN12K1
Προστάτη	PC-3, DU-145
Μαστού	MCF7, MDA-MB-231/ATCC, MDA-MB-468, HS 578T, MDA-N, BT-549, T-47D
Μικροκυτταρικός Πνεύμονα	DMS 114, SHP-77

κές κυτταρικές σειρές είναι τα πιο συνηθισμένα κυτταρικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται στην έρευνα του καρκίνου και στη διαδικασία ανάπτυξης των φαρμάκων. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι πιο συνηθισμένες ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται από το Εθνικό Ινστιτούτο Γεγίας των ΗΠΑ (NIH) <sup>45</sup>.

### 3.1. Εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης μέσω ελέγχου της βιωσιμότητας

Το πρώτο στάδιο στη διαδικασία του προκλινικού ελέγχου είναι να αξιολογηθεί η κυτταροτοξική δράση των προς μελέτη ουσιών και να γίνει μια διαλογή, ώστε να επιλεγούν αρχικά μόνο οι πιο κυτταροτοξικές έναντι σειράς καρκινικών κυττάρων. Στις περισσότερες από τις δοκιμασίες που εφαρμόζονται, ένα υπόστρωμα μετασχηματίζεται σε ένα έγχρωμο προϊόν από ενδοκυτταρικά ένζυμα που υπάρχουν στα

ζωντανά κύτταρα και το χρώμα που σχηματίζεται είναι ανάλογο του αριθμού των ζωντανών κυττάρων <sup>46</sup>. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται εν συντομίᾳ ορισμένες από τις πιο συνηθισμένες δοκιμασίες.

Μία από τις πιο συχνά εφαρμοζόμενες μεθόδους είναι η δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT με τη χρήση της ουσίας 3-(4,5-διμεθυλθειαζολ-2-υλ)-2,5-βρωμιούχο διφαινυλτετραζόλιο, που είναι μια ποσοτική χρωματομετρική μέθοδος <sup>47, 48</sup>. Στηρίζεται στην εκτίμηση της δραστικότητας των NAD(P)H-εξαρτώμενων ενζύμων της οξειδοαναγγάσης, τα οποία ανάγουν την κίτρινη ένωση MTT σε μωβ αδιάλυτους κρυστάλλους φορμαζάνης, οι οποίοι στη συνέχεια μπορούν να διαλυτοποιηθούν με κάπιοιν οργανικό διαλύτη, όπως το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) ή την ισοπροπανόλη, και να αναλυθούν φωτομετρικά <sup>47, 48</sup> στα 570 nm <sup>49</sup>. Επειδή η διαδικασία αυτή συντελείται μόνο στα μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων, η δοκιμασία MTT χρησι-

μοποιείται για να υπολογιστεί η βιωσιμότητα των κυττάρων και κατ' επέκταση η κυτταροτοξική δράση των ουσιών. Η διαδικασία συνήθως πραγματοποιείται σε πλάκες μικροτιτλοδότησης 96 φρεατίων (96-well plates). Αφού γίνει η κατάλληλη προετοιμασία των κυττάρων και η έκθεσή τους στις προς εξέταση ουσίες, προστίθεται το MTT σε κάθε φρεάτιο και ακολουθεί επώαση για 4 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια, προστίθεται το διάλυμα διαλυτοποίησης ώστε να διαλυθούν οι κρύσταλλοι φορμαζάνης και με τη χρήση των κατάλληλων μαρτύρων, πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση της απορρόφησης σε ένα φωτόμετρο μικροπλακών (ELISA reader).

Εκτός από το MTT υπάρχουν και άλλα ανάλογα του τετραζολίου, όπως το MTS [3-(4,5-διμεθυλθειαζολ-2-υλ)-5-(3-καρβοξυμεθοξυφαινυλ)-2-(4-σουλφοφαινυλ)-2H-τετραζόλιο] και το XTT [2,3-δις-(2-μεθοξυ-4-νιτρο-5-σουλφοφαινυλ)-2H-τετραζόλιο-5-καρβοξαμίδιο], η χρήση των οποίων επίσης παράγει φορμαζάνη μετά από αναγωγή από οξειδοαναγωγάσες ή αφυδρογονάσες<sup>46</sup>. Κατ' αναλογία με το MTT, οι δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας MTS και XTT περιλαμβάνουν ένα στάδιο επώασης 4 ωρών, όμως η ειδοπούς διαφορά τους με το MTT είναι ότι η διαλυτοποίηση της φορμαζάνης γίνεται μέσα στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας των κυττάρων. Συνεπώς, με τις μεθόδους XTT και MTS εξοικονομείται χρόνος και, παράλληλα, μειώνεται η πιθανότητα λάθους ή απώλειας έγχρωμου προϊόντος, καθώς δεν υπάρχει το στάδιο της διαλυτοποίησης. Και οι τρεις προαναφερθείσες μέθοδοι έχουν το πλεονέκτημα ότι είναι χαμηλού κόστους και εύκολες να πραγματοποιηθούν, αφού ως εξοπλισμό απαιτούν ένα φωτόμετρο μικροπλακών (ELISA reader) και για αυτόν το λόγο χρησιμοποιούνται ευρέως.

Η δοκιμασία SRB (σουλφοροδαμίνης B)<sup>50</sup> είναι άλλη μία κοινή χρωματομετρική μέθοδος που εκτιμά τη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων. Η χρωστική SRB προσδένεται σε πρωτεΐνες των ζωντανών κυττάρων κάτω από ήπια όξινες συνθήκες και για αυτόν το λόγο προστίθεται στα κύτταρα τριχλωροοξικό οξύ (TCA) και ακολουθεί επώαση 1 ώρας. Στη συνέχεια, μετά από διαδοχικές πλύσεις προστίθεται η χρωστική και ακολουθεί επώαση 30

λεπτών έως 1 ώρας. Τέλος, η χρωστική διαλυτοποιείται με την προσθήκη Tris Base (2-αμινο-2-(υδροξυμεθυλ)προπανο-1,3-διόλη) και μετράται η απορρόφηση στα 510 nm<sup>51</sup>. Τη συγκεκριμένη δοκιμασία προτείνει και εφαρμόζει και το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου (NCI) των ΗΠΑ.

Μια επιπρόσθετη μέθοδο αποτελεί η δοκιμασία LDH (γαλακτικής αφυδρογονάσης)<sup>52</sup>. Κατά τη συγκεκριμένη δοκιμασία, όταν τα προς εξέταση μόρια διαρρήξουν την πλασματική μεμβράνη, τα κύτταρα απελευθερώνουν LDH στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας και η απελευθερωμένη LDH μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με φωτομέτρηση στα 490 nm<sup>53</sup>. Ο χρόνος επώασης του διαλύματος με τα κύτταρα είναι 30 λεπτά, ενώ, όπως και στις δοκιμασίες XTT και MTS, δεν υπάρχει ανάγκη διαλυτοποίησης<sup>49</sup>.

Η δοκιμασία ATP (τριφωσφορικής αδενοσίνης) είναι μια επιπλέον διαδεδομένη δοκιμασία ελέγχου της κυτταρικής βιωσιμότητας που βασίζεται στη χημειοφωταύγεια<sup>54</sup>. Όταν τα κύτταρα οδηγούνται προς απόπτωση ή νέκρωση μετά από επώαση με μια δυνητικά κυτταροτοξική ουσία, το κυτταρικό περιεχόμενο σε ATP μειώνεται και μπορεί να ποσοτικοποιηθεί<sup>54</sup>. Η δοκιμασία CellTiter-Glo (της εταιρείας Promega Corporation, Madison, WI) αποτελεί παράδειγμα της πιο πρόσφατης τεχνικής, όπου μετράται το κυτταρικό περιεχόμενο ATP χρησιμοποιώντας το ένζυμο λουσιφεράση<sup>55</sup>. Το σήμα χημειοφωταύγειας σταθεροποιείται μέσα σε 10 λεπτά από την προσθήκη του αντιδραστήρου και μπορεί να μετρηθεί με λουμινόμετρο στα 560 nm. Η συγκεκριμένη δοκιμασία παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία και καλύτερη επαναληψιμότητα συγκριτικά με τις πιο παραδοσιακές δοκιμασίες<sup>55</sup>.

Εφαρμόζοντας κάποια από τις παραπάνω τεχνικές καθίσταται εφικτό να υπολογιστεί ο δείκτης IC50 (half maximal inhibitory concentration, μέση αναστατική συγκέντρωση). Ο δείκτης IC50 είναι η συγκέντρωση της υπό μελέτη κυτταροτοξικής ουσίας που προκαλεί το θάνατο στο 50% του αριθμού των κυττάρων και προκύπτει από τη σύγκριση της οπτικής απορρόφησης ή του φθορισμού του πληθυσμού των κυττάρων που έχουν εκτεθεί στην ουσία σε σχέση με τον αντίστοιχο κυτταρικό πληθυσμό που δεν έχει εκτεθεί στην ουσία. Όσο μικρότερη

Πίνακας 2. Βασικά χαρακτηριστικά των πιο συνηθισμένων δοκιμασιών κυτταροτοξικότητας

	MTT	MTS/ XTT	SRB	LDH	ATP
Μήκος Κύματος (nm)	570	492/510	510	490	560
Χρόνος Επώασης	4 ώρες	4 ώρες	1 + 1 ώρα	30 λεπτά	10 λεπτά
Ανάγκη Επαναδιάλυσης	Ναι με οργανικό διαλύτη (DMSO ή ισοπροπανόλη)	Όχι	Ναι με Tris-Base	Όχι	Όχι
Μέθοδος	Φωτομετρία	Φωτομετρία	Φωτομετρία	Φωτομετρία	Χημειοφωταύγεια

τιμή έχει ο δείκτης IC50, τόσο μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα εμφανίζει η ουσία.

### 3.2 Αξιολόγηση του επαγόμενου τύπου κυτταρικού θανάτου

Ένα επόμενο βήμα είναι να διερευνηθεί ο τύπος κυτταρικού θανάτου που επάγεται από τις ουσίες που επιλέχθηκαν μετά την αρχική σάρωση. Είναι πολύ σημαντικό να εντοπιστεί αφενός, το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων που πεθαίνουν, γιατί τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να διαφεύγουν της απόπτωσης για να επιβιώνουν έναντι των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή<sup>56</sup>. Αφετέρου, χρειάζεται να διερευνηθεί ποιο είδος κυτταρικού θανάτου επάγεται από τις υπό μελέτη ουσίες, απόπτωση ή νέκρωση, διότι πρόκειται για δύο διαδικασίες με διαφορετικά χαρακτηριστικά που μπορούν να έχουν διαφορετικές επιπτώσεις στον οργανισμό (Εικόνα 4).

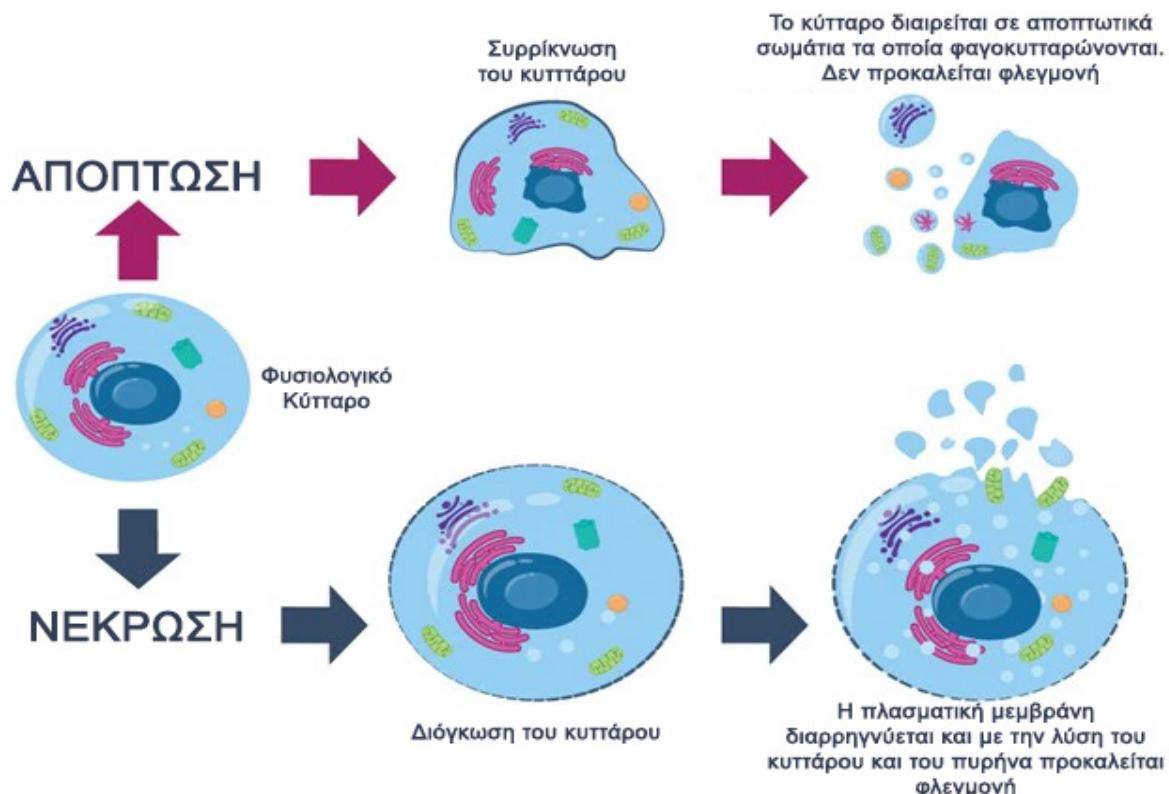
Συγκεκριμένα, η απόπτωση, ή αλλιώς ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, συνιστά μια φυσιολογική διεργασία του οργανισμού που συμμετέχει καταλυτικά στην ομαλή ανάπτυξη και λειτουργία σχεδόν όλων των ιστών. Χαρακτηρίζεται από συρρίκνωση του κυττάρου, αποσύνθεση του πυρηνικού φακέλου, συμπύκνωση της χρωματίνης και κατακερματισμό του DNA. Η επιφάνεια των κυττάρων συχνά σχηματίζει χαρακτηριστικά εξογκώματα και, εάν το κύτταρο είναι μεγάλο, διασπάται

σε θραύσματα που περικλείονται από μεμβράνη και ονομάζονται αποπτωτικά σωμάτια. Τα αποπτωτικά σωμάτια φαγοκυτταρώνονται από γειτονικά φαγοκύτταρα και ειδικότερα από μακροφάγα, χωρίς να απελευθερώνεται κυτταρικό περιεχόμενο στην περιοχή και συνεπώς, δεν προκαλείται φλεγμονώδης αντίδραση<sup>58</sup>.

Σε αντίθεση με την απόπτωση, τα ζωικά κύτταρα που πεθαίνουν ως απόκριση σε οξεία προσβολή, όπως συμβαίνει σε έναν τραυματισμό ή λόγω έλλειψης παροχής αίματος, συνήθως πεθαίνουν μέσω της διαδικασίας της κυτταρικής νέκρωσης. Κατά τη νέκρωση, τα νεκρωτικά κύτταρα διογκώνονται και εκρήγνυνται, απελευθερώνοντας το περιεχόμενό τους στον περιβάλλοντα χώρο, προκαλώντας έτσι έντονη φλεγμονώδη απόκριση<sup>58</sup>.

Για τον προσδιορισμό της απόπτωσης έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως η φωτονική μικροσκοπία<sup>59</sup>. Φαίνομενα που χαρακτηρίζουν την απόπτωση, όπως η αλλαγή στο σχήμα και στον όγκο των κυττάρων, η συρρίκνωση του κυττάρου και ο σχηματισμός των αποπτωτικών σωμάτων, μπορούν εύκολα να ανιχνευθούν μέσω της φωτονικής μικροσκοπίας<sup>60</sup>. Παρόλο που η φωτονική μικροσκοπία είναι μια χαμηλού κόστους και εύκολη μέθοδος, το κύριο μειονέκτημά της είναι η χαμηλή ευαισθησία της.

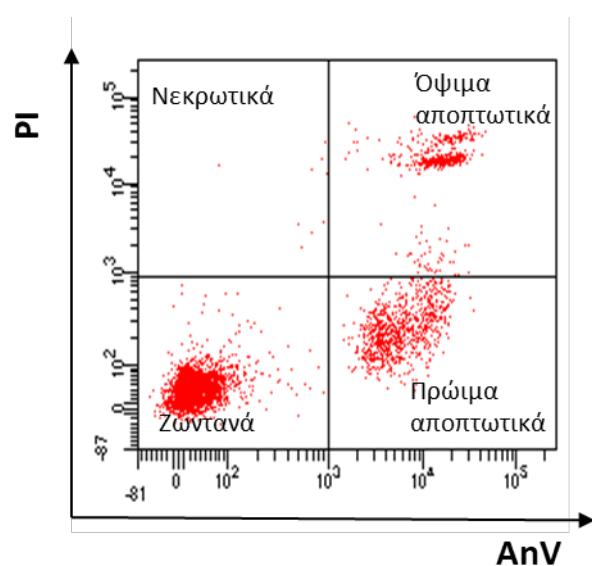
Για αυτόν το λόγο, χρησιμοποιείται ευρέως πλέον στην έρευνα του καρκίνου και συγκεκριμένα για τον έλεγχο του κυτταρικού θανάτου, η μικροσκοπία φθορισμού<sup>61, 62, 63</sup>. Το παρατηρούμενο δείγμα αρχι-



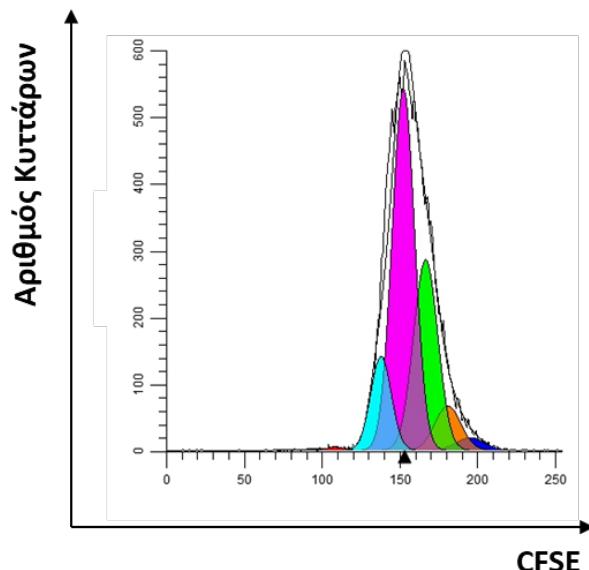
Εικόνα 4. Οι κυριότερες διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την απόπτωση και τη νέκρωση (Προσαρμοσμένο από την παραπομπή<sup>57</sup>).

κά διεγέρεται με φως μικρού μήκους κύματος και μπορεί να οπτικοποιηθεί μέσω φίλτρων<sup>61-63</sup>. Καθώς το φθορίζον σήμα ανιχνεύεται ως φωταύγεια σε ένα σκοτεινό περιβάλλον, είναι δυνατό να ανιχνευθούν ακόμα και πολύ μικρά φθορίζοντα μέρη του δείγματος. Ένας φθορίζων ανιχνευτής που εντοπίζει μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη ή ένα στόχο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την ανάλυση με μικροσκοπία φθορισμού. Ένα παράδειγμα αποτελεί η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein, GFP), που είναι φυσική πρωτεΐνη της μέδουσας *Aequorea victoria*, η οποία συνδέεται με τον πρωτεϊνικό υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Η GFP χρησιμοποιείται ως δείκτης για τον εντοπισμό του υποδοχέα στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα, ανάλογα με την ύπαρξη στεροειδούς ή όχι, αντίστοιχα<sup>64</sup>.

Παρόλα αυτά, ένας ταχύς και ακριβής τρόπος για την ποσοτικοποίηση του κυτταρικού θανάτου είναι η κυτταρομετρία ροής<sup>65, 66</sup>. Ο έλεγχος του επαγόμενου κυτταρικού θανάτου πραγματοποιείται σε κυτταρόμετρο ροής μετά από χρώση των κυττάρων με αννεξίνη V και ιωδιούχο προπίδιο (PI). Στα αποπτωτικά κύτταρα, το μεμβρανικό φωσφολιπίδιο φωσφατιδυλοσερίνη (PS) μετατοπίζεται από την εσωτερική προς την εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και έτσι εκτίθεται στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Η αννεξίνη V είναι μια εξαρτώμενη από το ασβέστιο ( $Ca^{2+}$ ) πρωτεΐνη δέσμευσης φωσφολιπιδών (35-26 kDa), η οποία εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τη PS και συνδέεται με τα κύτταρα που την εκθέτουν στην επιφάνειά τους. Η αννεξίνη V είναι συζευγμένη με φθοριοχρώματα, όπως η φλουορεσκεΐνη (FITC), και συνεπώς μπορεί να



**Εικόνα 5.** Αντιπροσωπευτική εικόνα ανάλυσης μέσω κυτταρομετρίας ροής μετά από χρώση με αννεξίνη V σημασμένη με FITC (AnV, οριζόντιος άξονας) και ιωδιούχο προπίδιο (PI, κάθετος άξονας). Τα κύτταρα σε κάθε τεταρτημόριο χαρακτηρίζονται ως ζωντανά (AnV-PI-, κάτω αριστερό τεταρτημόριο), πρώιμα αποπτωτικά (AnV+PI-, κάτω δεξί τεταρτημόριο), όψιμα αποπτωτικά (AnV+PI+, πάνω δεξί τεταρτημόριο) και νεκρωτικά (AnV-PI+, πάνω αριστερό τεταρτημόριο).

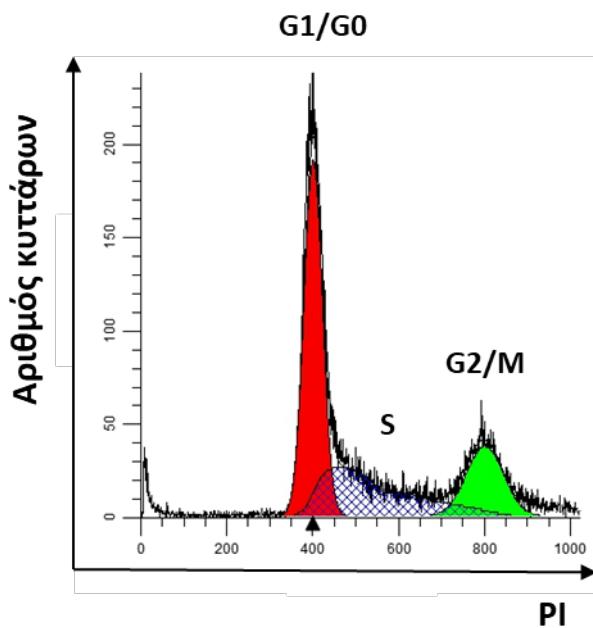


**Εικόνα 6.** Αντιπροσωπευτικό διάγραμμα μετά από ανάλυση κυτταρομετρίας ροής, που απεικονίζει τη μεταβολή του πληθυσμού των γενεών των κυττάρων καρκίνου του μαστού SKBR3 μετά από χρώση με CFSE και επώαση με μια δυνητικά αντικαρκινική ουσία. Τα διαφορετικά χρώματα στο γράφημα αντιστοιχούν σε διαφορετικές γενεές, ξεκινώντας από δεξιά με τη μητρική γενεά (μπλε σκούρο) και συνεχίζοντας προς τα αριστερά με τις θυγατρικές της (πορτοκαλί, πράσινο, ροζ, γαλάζιο), με το ύψος της κάθε καμπύλης να αντιστοιχεί στον αριθμό των κυττάρων κάθε γενεάς.

λειτουργήσει ως ένας ευαίσθητος ανιχνευτής των κυττάρων που οδηγούνται σε απόπτωση μέσω κυτταρομετρίας ροής. Η χρώση με αννεξίνη V προηγείται της απώλειας της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία λαμβάνει χώρα κυρίως κατά τη νέκρωση. Επιπλέον, χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες χρωστικές, όπως το PI, για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των αποπτωτικών κυττάρων από τα νεκρωτικά κύτταρα. Σε ζωντανά κύτταρα με άθικτη μεμβράνη το PI παραμένει εξωκυτταρικά, ενώ οι μεμβράνες των νεκρών και κατεστραμμένων κυττάρων είναι διαπερατές σε αυτό. Επομένως, τα κύτταρα χαρακτηρίζονται ως ζωντανά (AnV-PI-), πρώιμα αποπτωτικά (AnV+PI-), όψιμα αποπτωτικά (AnV+PI+) και νεκρωτικά (AnV-PI+) (Εικόνα 5).

Η ισχυρή κυτταροτοξικότητα όμως από μόνη

της δεν αρκεί. Μια ουσία που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί δυνητικά ως αντικαρκινικό φάρμακο θα πρέπει, εκτός από κυτταροτοξική, να είναι και εκλεκτική, δηλαδή να είναι τοξική μεν για τα καρκινικά κύτταρα, όμως ταυτόχρονα να μη δρα έναντι των υγιών κυττάρων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εργασία των Vega-Perez και συνεργατών<sup>67</sup> όπου ελέγχθηκαν για την αντικαρκινική τους δράση μια σειρά παραγώγων της αζιριδίνης. Στη συγκεκριμένη εργασία, το πιο κυτταροτοξικό παράγωγο ενάντια στην ανθρώπινη σειρά καρκίνου του πνεύμονα A549 δεν ήταν εκλεκτικό, καθώς ήταν 7 φορές περισσότερο τοξικό έναντι των υγιών κυττάρων. Για περαιτέρω μελέτες επιλέχθηκε ένα άλλο παράγωγο λιγύτερο τοξικό απέναντι στην καρκινική σειρά, όμως παράλληλα πιο εκλεκτικό. Μάλιστα, η εκλε-



**Εικόνα 7.** Αντιπροσωπευτικό διάγραμμα μετά από ανάλυση κυτταρομετρίας ροής, που απεικονίζει την κατανομή ενός πληθυσμού από τα κύτταρα καρκίνου του μαστού SKBR3 μετά από επώαση με μια δυνητικά αντικαρκινική ουσία και χρώση με PI. Τα διαφορετικά χρώματα στο γράφημα αντιστοιχούν σε διαφορετικά στάδια του κυτταρικού κύκλου, ξεκινώντας από αριστερά με τη φάση G1/G0 (κόκκινο χρώμα), δεξιά με τη φάση G2/M (πράσινο χρώμα) και με τη φάση S (σκιαγραφημένη περιοχή) να εκτείνεται μεταξύ των δύο πρώτων.

κτικότητά του ήταν 50-100 φορές μεγαλύτερη ενάντια στις καρκινικές σειρές του μαστού συγκριτικά με τα υγιή κύτταρα.

Γίνεται επομένως αντιληπτή η σημασία να ελέγχεται η τοξικότητα και στα υγιή κύτταρα. Επειδή η πλειοψηφία των αντικαρκινικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται κλινικά εισάγονται στην κυκλοφορία του αίματος μέσω ενδοφλέβιας χορήγησης, τα φυσιολογικά μονοπύρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMCs) είναι συνήθως τα πρώτα κύτταρα που έρχονται σε επαφή με τις πιο υψηλές συγκεντρώσεις των φαρμάκων. Συνεπώς, τα κύτταρα αυτά αποτελούν ένα σημαντικό εργαλείο για να αξιολογηθεί η τοξικότητα των προς εξέταση ουσιών

<sup>68</sup> και χρησιμοποιούνται συχνά για τον έλεγχο της τοξικότητας νέων ουσιών, όπως από τους Samara και συνεργάτες <sup>69</sup>. Τα PBMCs απομονώνονται συνήθως από υγιείς δότες και επωάζονται με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των προς μελέτη ουσιών. Οι τιμές των συγκεντρώσεων θα πρέπει να επιλέγονται έτσι ώστε να συμπεριλαμβάνουν τις τιμές IC50 (που υπολογίστηκαν μέσω της αντίστοιχης δοκιμασίας ελέγχου βιωσιμότητας για τα καρκινικά κύτταρα), καθώς και να τις υπερβαίνουν για να προσδιοριστεί καλύτερα το εύρος της τοξικότητάς τους.

### 3.3 Έλεγχος επαγωγής κυτταροστατικότητας

Ένα άλλο σημαντικό στοιχείο που αξίζει να ελεγχθεί είναι η κυτταροστατικότητα μέσω του βαθμού μεταβολής του διπλασιασμού των κυττάρων. Η αξιολόγησή της γίνεται συνήθως μετά από χρώση με τη φθορίζουσα χρωστική CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) και ανάλυση μέσω κυτταρομετρίας ροής. Η συγκεκριμένη χρωστική απορροφάται πλήρως από κάθε κύτταρο, και η ποσότητά της ημιδιπλασιάζεται με κάθε κυτταρική διαίρεση, κάτι το οποίο ανιχνεύεται εύκολα μέσω του μειωμένου φθορισμού της. Έτσι καθίσταται εφικτός ο διαχωρισμός και η ποσοτικοποίηση των κυτταρικών γενεών, καθώς η χρωστική κατανέμεται ισόποσα μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση (Εικόνα 6).

### 3.4 Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου

Ένα ακόμα σημαντικό στοιχείο προς αξιολόγηση είναι η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου, για την οποία ανάλυση επίσης χρησιμοποιείται συνήθως η κυτταρομετρία ροής μετά από χρώση με PI. Το PI αποτελεί μία παρεμβαλλόμενη στο δίκλωνο μόριο DNA χρωστική, η οποία, μέσω του φθορισμού της, μας δίνει τη δυνατότητα εκτίμησης της ποσότητας του DNA σε κάθε κύτταρο και, κατ' επέκταση, της φάσης του κύκλου που αυτό διανύει. Ο αρνητικός μάρτυρας παρουσιάζει μια συγκεκριμένη κατανομή των κυττάρων στις τρεις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, επομένως οποιαδήποτε αλλαγή στο διάγραμμα υποδηλώνει και έναν διαφορετικό μηχανι-

σμό δράσης της υπό μελέτη αντικαρκινικής ουσίας (Εικόνα 7).

Ο κατάλληλος συνδυασμός των *in vitro* δοκιμασιών μπορεί να παρέχει πολύ σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την κυτταροτοξικότητα και τους μηχανισμούς δράσης των υποψήφιων φαρμακευτικών μορίων και να αυξήσει τις πιθανότητες επιτυχίας στα μετέπειτα κλινικά στάδια. Εξάλλου, η μείωση των ζωικών δοκιμών αποτελεί ιατρική αναγκαιότητα και κατ' επέκταση, οι *in vitro* δοκιμασίες είναι ζωτικής σημασίας προτού ξεκινήσει ο έλεγχος των φαρμάκων σε πειραματικά μοντέλα ζώων.

#### **4. *In vivo* μοντέλα για την ανάλυση νέων αντικαρκινικών μορίων**

Οι μελέτες σε κυτταρικά συστήματα *in vitro* παρέχουν πολύ σημαντικές πληροφορίες, όμως, δεν είναι αρκετές για να αντικατοπτρίσουν τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα σε έναν ζωντανό οργανισμό. Για αυτόν το λόγο, η ανάπτυξη ζωικών μοντέλων για τον έλεγχο νέων αντικαρκινικών ουσιών και *in vivo* έχει μεγάλη σημασία. Μάλιστα, στην έρευνα του καρκίνου, πάνω από το 95% των *in vivo* μελετών χρησιμοποιούν μοντέλα όγκων σε ποντικούς<sup>70</sup>.

Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μοντέλα αφορούν είτε ανοσοκατεσταλμένους είτε ανοσοϊκανούς ποντικούς, στους οποίους εγχέονται υποδόρια ή ορθοτοπικά αλλομοσχεύματα ή ξενομοσχεύματα όγκων<sup>71</sup>. Το χαμηλό κόστος και η ευκολία στη χρήση καθιστούν αυτά τα μοντέλα τα πιο διαδεδομένα.

Ένας ακόμα τύπος μοντέλου που χρησιμοποιείται στην προκλινική έρευνα είναι οι γενετικά τροποποιημένοι ή διαγονιδιακοί ποντικοί, στους οποίους μπορούν να διερευνηθούν οι δράσεις και οι λειτουργίες των σχετιζόμενων ογκογονιδίων. Τα διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών χρησιμοποιούνται, όπως και τα μοντέλα μοσχευμάτων, για την *in vivo* μελέτη θεραπευτικών πρωτοκόλλων. Τα διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών είναι γενικά πολύ χρονοβόρα και ακριβά στη δημιουργία τους, και απαιτούν για τη χρήση τους ένα υψηλά καταρτισμένο προσωπικό.

Επιπλέον, υπάρχουν και τα προερχόμενα από ασθενείς μοντέλα ξενομοσχευμάτων (patient-

derived xenograft, PDX), στα οποία γίνεται εμφύτευση ανθρώπινων όγκων σε ποντικούς με εξανθρωποποιημένο ανοσοποιητικό σύστημα. Αυτοί οι ποντικοί αποτελούν πρότυπους οργανισμούς, οι οποίοι προσομοιάζουν τις συγκεκριμένες χαρακτηριστικές ιδιότητες του μικροπεριβάλλοντος του όγκου του ασθενούς, γεγονός που τους καθιστά κατάλληλα εργαλεία μελέτης των καρκίνων του ανθρώπου<sup>72</sup>.

Μετά την ολοκλήρωση του *in vivo* μοντέλου, μπορεί επιπλέον να διερευνηθεί αν η προς μελέτη ουσία επάγει ειδικές ή/και μη ειδικές αντικαρκινικές ανοσοαπαντήσεις στα ποντίκια.

Ιστορικά, η πιο διαδεδομένη μέθοδος για να υπολογιστεί η επαγωγή κυτταροτοξικότητας από τα λεμφοκύτταρα είναι μέσω της δοκιμασίας απελευθέρωσης του ραδιενεργού χρωμίου (51Cr). Κατά τη διαδικασία αυτή, τα κύτταρα-στόχοι σημαίνονται ενδοκυτταρικά με 51Cr, συνεπωάζονται με τα δραστικά κύτταρα και η κυτταρική λύση των κυττάρων-στόχων από τα δραστικά κύτταρα οδηγεί στην απελευθέρωση ραδιενέργειας στο κυτταρικό υπερκείμενο, η οποία ανιχνεύεται και ποσοτικοποιείται μέσω μετρητών γ-ακτινοβολίας<sup>73</sup>. Αν και χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα, η συγκεκριμένη μέθοδος έχει αρκετά μειονεκτήματα συμπεριλαμβανομένων της έλλειψης πληροφοριών για την συμπεριφορά των κυττάρων μετά τη σήμανσή τους με το ραδιενέργειο στοιχείο, του υψηλού κόστους, της ανάγκης για ειδικό εξοπλισμό, του μικρού χρόνου ημιζωής των ραδιενέργων στοιχείων, καθώς και της παραγωγής επικίνδυνων αποβλήτων<sup>74</sup>.

Προκειμένου να αντιμετωπιστούν τα παραπάνω προβλήματα, έχουν αναπτυχθεί καινούριες μέθοδοι με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής. Μία από αυτές είναι η δοκιμασία κυτταροτοξικότητας με τη χρήση αντισωμάτων έναντι του μορίου CD107 (anti-CD107). Κατά την αποκοκκίωση των δραστικών κυττάρων, το CD107 εκτίθεται στην επιφάνειά τους, εντοπίζεται από σημασμένα με φθορίζουσες χρωστικές αντισώματα και έτσι, καθίσταται εφικτό να ανιχνευθεί η ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών (CD8+ T και NK) λεμφοκυττάρων. Τα συγκεκριμένα λεμφοκύτταρα περιέχουν εκκριτικά λυσοσώματα ή λυτικά κοκκία, στο εσωτερικό των οποίων

υπάρχουν κυτταροτοξικά μόρια (κυρίως περφορίνη και θρυμματίνες). Όταν αναγγνώρισουν ένα κύτταρο-στόχο, τα κοκκία τους συσσωρεύονται προς την περιοχή που προσεγγίζει την κυτταροπλασματική μεμβράνη του κυττάρου-στόχου, συντήκονται στην περιοχή της ανοσολογικής σύναψης με τη μεμβράνη του δραστικού κυτταροτοξικού κυττάρου και το περιεχόμενό τους απελευθερώνεται με εξωκύττωση στο μεσοκυττάριο χώρο, οδηγώντας τελικά τα κύτταρα-στόχους σε απόπτωση<sup>75,76</sup>.

Παράλληλα, εκτός από την απελευθέρωση του περιεχομένου των κοκκίων, εκφράζονται στην επιφάνεια του δραστικού κυτταροτοξικού κυττάρου και οι γλυκοπρωτεΐνες του λυσοσώματος (CD107a και CD107b), που ανιχνεύονται μέσω κυτταρομετρίας ροής με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων.

Είναι σημαντικό επίσης να αποσαφηνιστεί ότι η δοκιμασία του 51Cr εξετάζει το βαθμό θανάτωσης των κυττάρων-στόχων, ενώ η δοκιμασία αποκοκκίωσης με ανίχνευση του CD107 ελέγχει το βαθμό ενεργοποίησης των δραστικών (κυτταροτοξικών) κυττάρων.

## 5. Παράδειγμα ροής πειραμάτων για τον έλεγχο της αντικαρκινικής δράσης μιας νέας ημι-συνθετικής ουσίας

Έχοντας ήδη περιγράψει τις τεχνικές που εφαρμόζονται, παρακάτω παρουσιάζεται η προτυποποιημένη διαδικασία που εφαρμόζεται στη Μονάδα Κυτταρομετρίας Ροής του Τμήματος Βιολογίας σε συνεργασία με το Τμήμα Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ.

Αρχικά, γίνεται σάρωση της σειράς των νέων αντικαρκινικών ουσιών (στο συγκεκριμένο παράδειγμα των παραγώγων της ολευρωπεΐνης Α, Β, Γ, Δ και Ε), παράλληλα με το θετικό μάρτυρα (στη συγκεκριμένη περίπτωση το χημειοθεραπευτικό δοξορουβικίνη), με τη δοκιμασία MTT σε ένα σύνολο 3 ανθρώπινων καρκινικών σειρών [μαστού SKBR3 (κυτταρική σειρά που στη βιβλιογραφία έχει εκτενώς χρησιμοποιηθεί για τη σάρωση αναλόγων της ολευρωπεΐνης), αωθηκών SKOV3 (παρεμφερής με την SKBR3 ως προς την έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων, προγεστερόνης και HER2), και τραχήλου της μήτρας HeLa (ως πρότυπη σειρά αναφο-

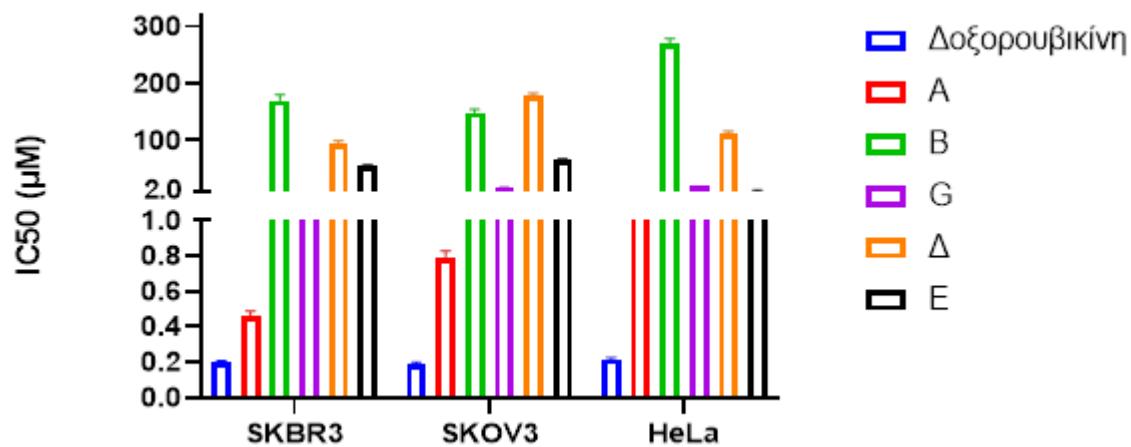
ράς που χρησιμοποιείται ευρέως)]. Από τα αποτελέσματα (Εικόνα 8) προέκυψε ότι τα ανάλογα Α και Γ παρουσιάζουν την καλύτερη κυτταροτοξικότητα (δηλαδή έχουν τιμές IC50<10 μΜ) και στις 3 κυτταρικές σειρές. Το ανάλογο Ε έχει μεν χαμηλή τιμή IC50 στην κυτταρική σειρά HeLa, αλλά στις υπόλοιπες καρκινικές σειρές η τιμή IC50 είναι μεγαλύτερη των 50 μΜ οπότε θεωρήθηκε μη δραστικό. Το ίδιο ισχύει και για τα ανάλογα Β και Δ, καθώς δεν είναι δραστικά σε καμία από τις 3 κυτταρικές σειρές (Εικόνα 8).

Όσον αφορά στον επαγόμενο τύπο κυτταρικού θανάτου για τα ανάλογα Α και Γ που επελέγησαν από την δοκιμασία MTT, χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής μετά από επώαση των κυττάρων με τα Α και Γ και χρώση τους με αννεξίνη V-PI, τα αποτελέσματα έδειξαν για το ανάλογο Α ότι θανατώνει την πλειοψηφία των καρκινικών κυττάρων (61,9%) και υπάρχει μια σαφής μετατόπιση προς την αποπτωτική περιοχή (61,7%), ενώ το ποσοστό της νέκρωσης είναι αμελητέο (0,2%) (Εικόνα 9). Συνεπώς, η συγκεκριμένη ουσία επάγει αποπτωτικό τύπο θανάτου στα καρκινικά κύτταρα και όχι νέκρωση.

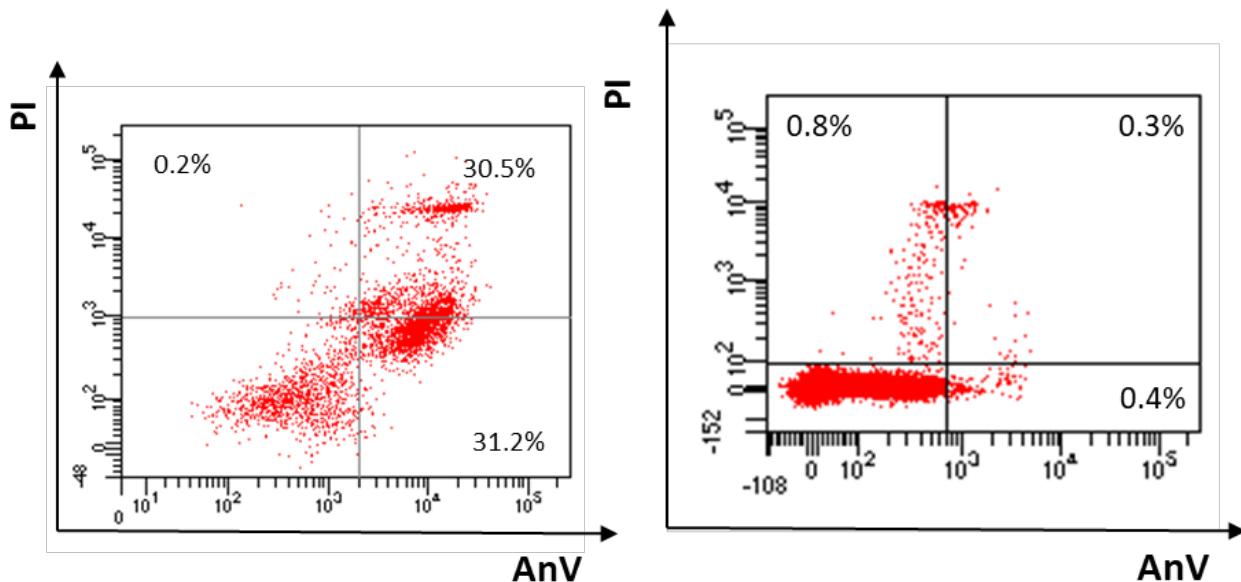
Επιπλέον, ο έλεγχος του επαγόμενου κυτταρικού θανάτου από το ανάλογο Α σε PBMCs απομονωμένα από υγιείς δότες, έδειξε ότι προκαλεί εξαιρετικά χαμηλή τοξικότητα, καθώς το 98,2% των υγιών κυττάρων παρέμειναν ζωντανά (Εικόνα 10, κάτω αριστερό τεταρτημόριο). Συνεπώς, αυτό το θετικό αποτέλεσμα επιτρέπει την περαιτέρω διερεύνηση του αναλόγου Α.

Αναφορικά με την κυτταροστατικότητα, τα αποτελέσματα που προέκυψαν (Εικόνα 11) ήταν τα εξής: στα καρκινικά κύτταρα που επωάστηκαν απουσία αναλόγου Α (αρνητικός μάρτυρας), ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός προχώρησε ανεμπόδιστα μέχρι την 5η γενεά, ενώ επώαση των ίδιων κυττάρων με το ανάλογο Α φαίνεται να οδηγεί σε στάση του διπλασιασμού, καθώς τα κύτταρα φτάνουν μέχρι την 4η γενεά, πράγμα που υποδεικνύει την επαγγωγή κυτταροστατικότητας από το συγκεκριμένο ανάλογο Α.

Όσον αφορά στην ανάλυση του κυτταρικού κύκλου, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα καρκινικά

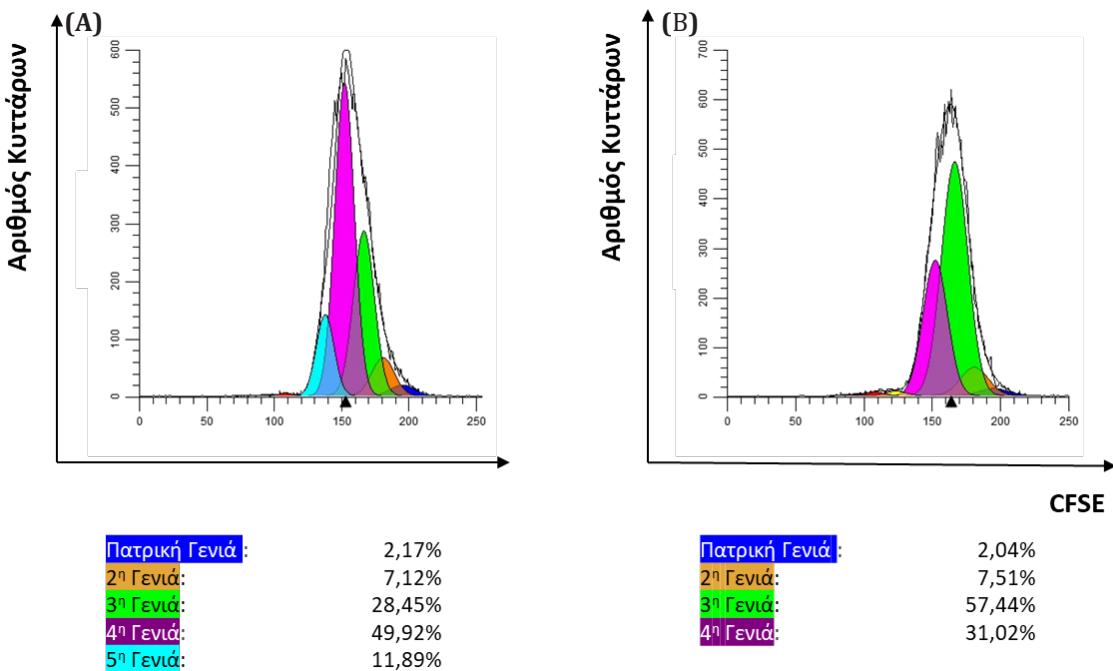


Εικόνα 8. Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας μέσω της δοκιμασίας MTT, όπου απεικονίζονται οι μέσες τιμές IC50 5 διαφορετικών παραγώγων της ολευρωπεΐνης (A-E) έπειτα από επώαση 72 ωρών με τις 3 ανθρώπινες καρκινικές σειρές SKBR3, SKOV3 και HeLa. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η δοξορουβικίνη (μπλε στήλες).



Εικόνα 9. Αντιπροσωπευτικό στικτόγραμμα κυτταρομετρίας ροής μετά από επώαση 72 ωρών της κυτταρικής σειράς SKBR3 με το ανάλογο A και χρώση των κυττάρων με αννεξίνη V (AnV) και ιωδιούχο προπίδιο (PI). Οι αριθμοί αντιστοιχούν στα ποσοστά των κυττάρων ανά τεταρτημόριο.

Εικόνα 10. Αντιπροσωπευτικό στικτόγραμμα κυτταρομετρίας ροής για τον έλεγχο της τοξικότητας έναντι PBMCs απομονωμένων από υγιή δότη. Τα PBMCs επωάστηκαν για 24 ώρες με το ανάλογο A στην προσδιορισθείσα από τη δοκιμασία MTT συγκέντρωση IC50, και ακολούθησε χρώση με αννεξίνη V (AnV) και ιωδιούχο προπίδιο (PI). Οι αριθμοί αντιστοιχούν στα ποσοστά των κυττάρων ανά τεταρτημόριο.



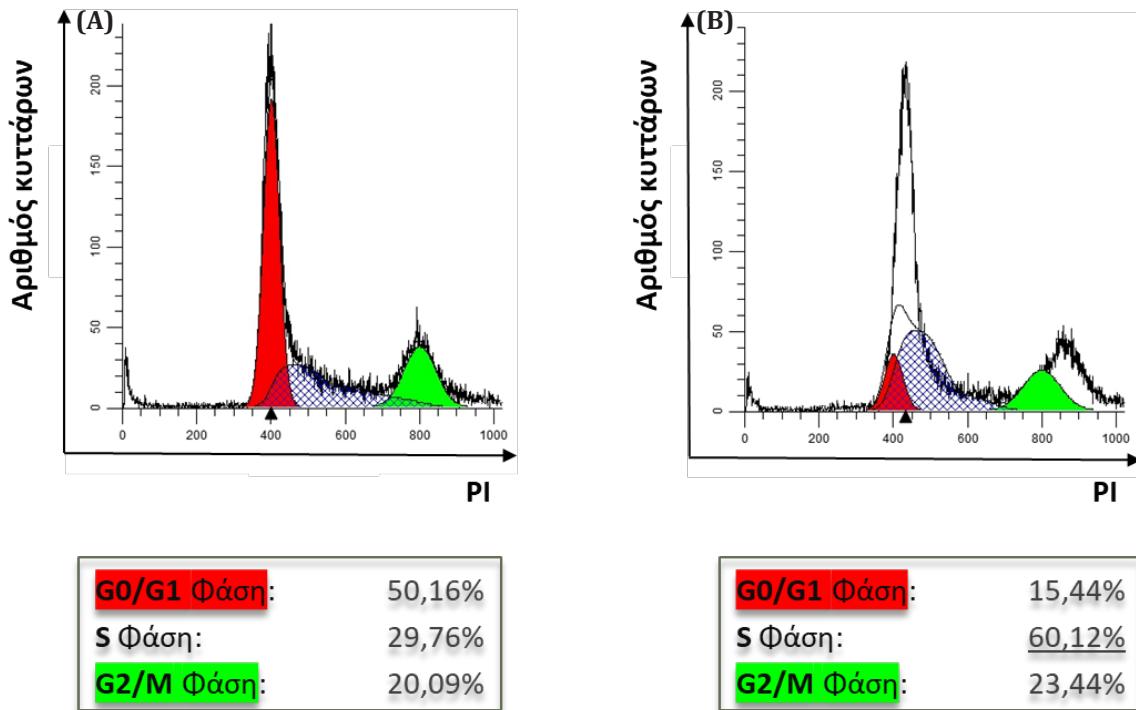
**Εικόνα 11.** Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα ελέγχου της κυτταροστατικότητας μετά από χρώση με CFSE. Απεικονίζονται ιστογράμματα της έντασης φθορισμού της χρωστικής CFSE (οριζόντιος άξονας) συναρτήσει του αριθμού των κυττάρων (κάθετος άξονας), με τη μεταβολή του πληθυσμού των γενεών κυττάρων SKBR3 μετά από επώαση 72 ωρών **(Α)** απουσία αναλόγου (αρνητικός μάρτυρας) όπου παρατηρούμε τη διαίρεση των κυττάρων για 5 γενεές (γαλάζια κορυφή), και **(Β)** παρουσία της κυτταροστατικής ουσίας A, όπου η κυτταρική διαίρεση σταματά στην 4η γενεά (ροζ κορυφή). Οι αριθμοί αναφέρονται σε ποσοστά κυττάρων ανά γενεά.

κύτταρα που επωάστηκαν απουσία του αναλόγου A (αρνητικός μάρτυρας) παρουσιάζουν μια φυσιολογική κατανομή στις 3 φάσεις του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 12). Αντίθετα, μετά από επώαση με το ανάλογο A, τα ίδια κύτταρα παρουσιάζουν μια εντελώς διαφορετική εικόνα και παρατηρείται στάση τους στη φάση S, κάτι που προφανώς οφείλεται στον μηχανισμό δράσης του αναλόγου A που εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.

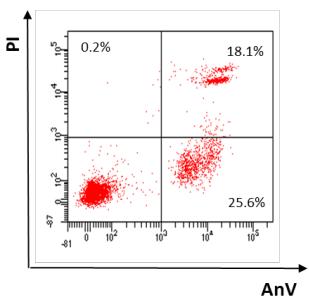
Επιπλέον, το εργαστήριο έλεγχε τον τύπο κυτταρικού θανάτου που επάγει το ανάλογο A στην ποντικίσια καρκινική σειρά μελανώματος B16.F1, η οποία χρησιμοποιείται στα *in vivo* πειράματα που ακολουθούν. Τα αποτελέσματα (Εικόνα 13) έδειξαν ότι η δραστικότητα του αναλόγου A έναντι και των κυττάρων ποντικού είναι ανάλογη αυτής στις ανθρώπινες καρκινικές σειρές, καθώς, στο 43,9% των

μελανωματικών κυττάρων B16.F1 επάγεται από-πτωση, ενώ μόλις στο 0,2% νέκρωση.

Για τα *in vivo* πειράματα χρησιμοποιήθηκε θεραπευτικό μοντέλο όγκου, όπου στη ραχιαία περιοχή ποντικών της φυλής C57BL/6J ενοφθαλμίστηκαν υποδόρια κύτταρα της συγγενικής σειράς μελανώματος B16.F1, και όταν οι όγκοι έγιναν ψηλαφητοί, χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά το ανάλογο A. Οι μετρήσεις που καταγράφηκαν έδειξαν μείωση του ρυθμού αύξησης των όγκων στα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε το ανάλογο A σε 2 διαφορετικές δόσεις (4 και 8 µg/ζώο) σε σύγκριση με τα ποντίκια-μάρτυρες στα οποία χορηγήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων (PBS). Η μείωση των όγκων ήταν στατιστικά σημαντική ήδη από τις ημέρες 25 και 19 για τις ποσότητες των 4 και 8 µg/ζώο, αντίστοιχα (Εικόνα 14).

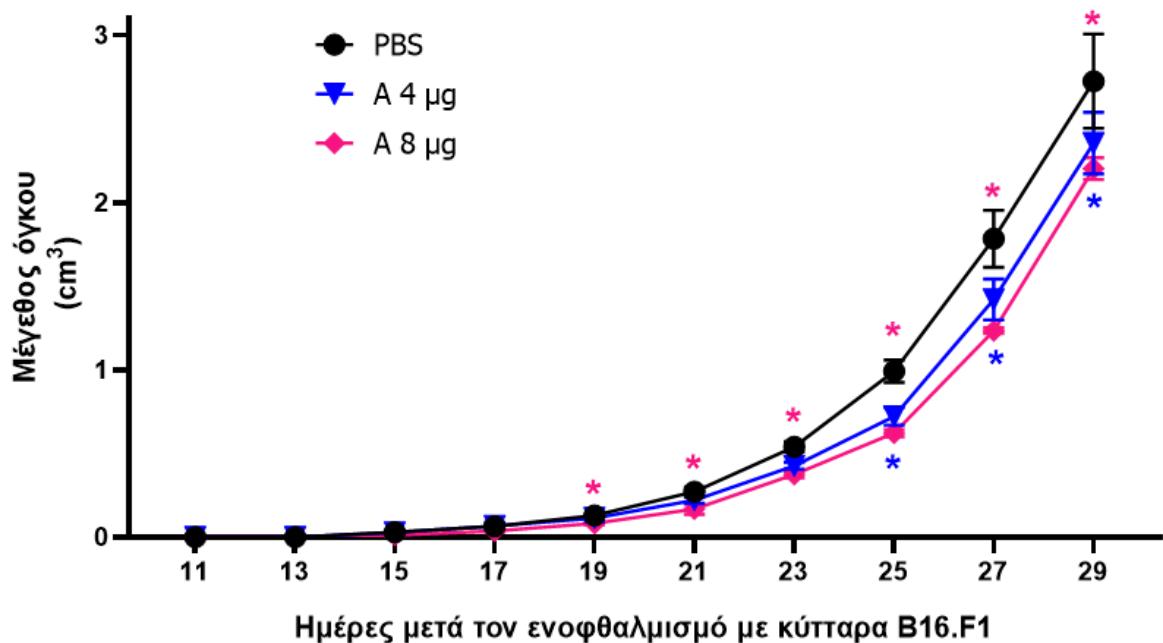


Εικόνα 12. Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα ανάλυσης του κυτταρικού κύκλου κυττάρων SKBR3 μετά από επώαση 72 ωρών με το ανάλογο A και χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (PI). Στο ιστόγραμμα (A), απουσία αναλόγου A (αρνητικός μάρτυρας), τα κύτταρα κατανέμονται φυσιολογικά και στις 3 φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Στο ιστόγραμμα (B), μετά από επώαση με το ανάλογο A, το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων (60, 12%) έχει σταματήσει στη φάση S. Οι αριθμοί στον πίνακα αναφέρονται σε ποσοστά κυττάρων ανά φάση του κυτταρικού κύκλου.



Εικόνα 13. Αντιπροσωπευτικό στικτόγραμμα κυτταρομετρίας ροής μετά από επώαση 72 ωρών της κυτταρικής σειράς μελανώματος ποντικού B16.F1 με το ανάλογο A και χρώση των κυττάρων με αννεξίνη V (AnV) και ιωδιούχο προπίδιο (PI). Οι αριθμοί αντιστοιχούν στα ποσοστά των κυττάρων ανά τεταρτημόριο.

Μετά το πέρας του πειράματος, τα ποντίκια ευθανατώθηκαν και τα όργανά τους συλλέχθηκαν για περαιτέρω αναλύσεις. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ιστολογική χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (H&E) και πλήθος ανοσοϊστοχημικών χρώσεων σε τομές των όγκων από ποντικούς στους οποίους χορηγήθηκε το ανάλογο A, για να ελεγχθεί η διήθηση των όγκων από ανοσοκύτταρα, συγκεκριμένα από CD3+, CD4+ και CD8+ T λεμφοκύτταρα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (Εικόνα 15), στις ομάδες που έλαβαν τις θεραπευτικές δόσεις του αναλόγου A παρατηρήθηκε διάχυτη διήθηση από CD3+ T λεμφοκύτταρα, αλλά και από CD4+ βοηθητικά και CD8+ κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενθαρρυντικά καθώς η πυκνή διήθηση από λεμφοκύτταρα είναι ένα κοι-



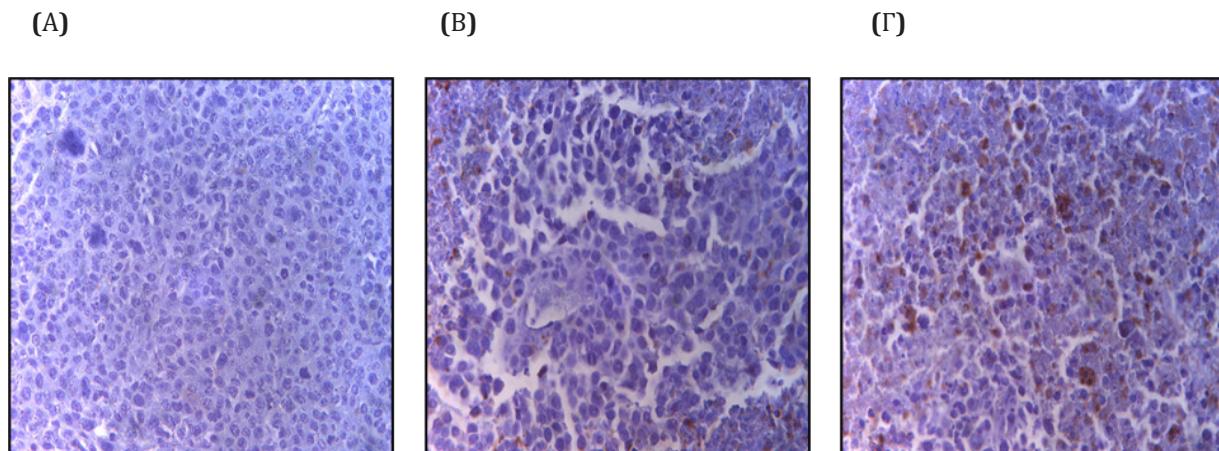
Εικόνα 14. Αντιπροσωπευτικό διάγραμμα των μεγέθους των μετρηθέντων όγκων μελανώματος σε ποντικούς C57BL/6J (κάθετος άξονας) από την 11η ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό των ποντικών με τα κύτταρα B16.F1, όπου οι όγκοι ήταν ψηλαφητοί, μέχρι την 29η ημέρα, όπου τα ζώα ευθανατώθηκαν. Στα ποντίκια χορηγήθηκε το ανάλογο A σε δόσεις 4 µg/ζώο (μπλε γραμμή) και 8 µg/ζώο (κόκκινη γραμμή). Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε ισόποσο ρυθμιστικό διαλύματος αλάτων (PBS, μαύρη γραμμή). Απεικονίζονται οι μέσοι όροι και η τυπική απόκλιση. \*, p<0,05.

νό χαρακτηριστικό των όγκων με ανοσο-ανεκτικό (immune-permissive) μικροπεριβάλλον, που έχουν ευνοϊκότερη εξέλιξη και καλύτερη πρόγνωση.<sup>77-79</sup>

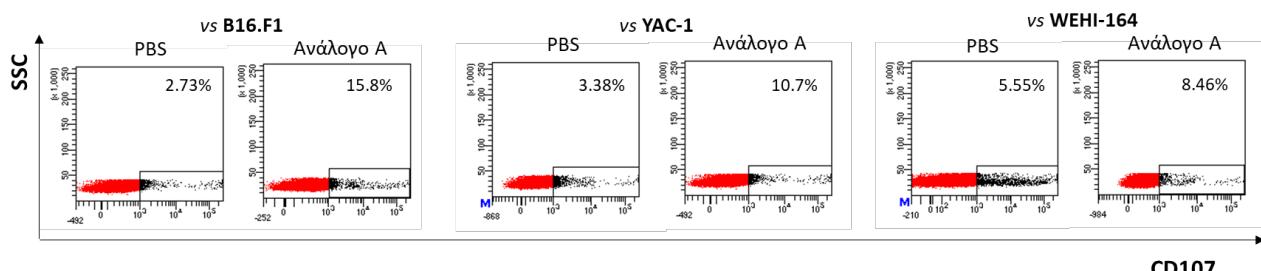
Η επιβράδυνση που παρατηρήθηκε στην ανάπτυξη των όγκων *in vivo* μετά τη χορήγηση του αναλόγου A, καθώς και η διήθησή τους από ανοσοκύτταρα μετά από ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, οδήγησε στη διερεύνηση για την επαγωγή ειδικών ή/και μη ειδικών αντικαρκινικών ανοσοαπαντήσεων στα ποντίκια. Μετά την ευθανασία των ζώων, απομονώθηκαν υπό άσηπτες συνθήκες τα σπληνοκύτταρά τους και ελέγχθηκαν *ex vivo* ως προς την ικανότητά τους να λύουν τα συγγενικά κύτταρα μελανώματος B16.F1, καθώς και τα καρκινικά κύτταρα των σειρών YAC-1 [ευαίσθητα σε λύση από φυσικά φρονικά (NK) κύτταρα] και WEHI 164 [ευαίσθητα σε λύση

από ενεργοποιημένα με λεμφοκίνες (LAK) κύτταρα] μέσω της δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής και αντισωμάτων έναντι του μορίου CD107 (anti-CD107).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα σπληνοκύτταρα από τους ποντικούς στους οποίους χορηγήθηκε δόση του αναλόγου A 8 µg/ζώο, παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του δείκτη CD107, συνεπώς υψηλότερη κυτταροτοξικότητα έναντι όλων των κυττάρων-στόχων, και κυρίως έναντι των συγγενικών κυττάρων B16.F1 (Εικόνες 16 και 17). Συγκεκριμένα, το ποσοστό των CD107+ λεμφοκυττάρων μετά από επώαση με τα κύτταρα B16.F1 ήταν 15,8%, ενώ τα ποσοστά για τις άλλες 2 κυτταρικές σειρές, YAC-1 και WEHI 164, ήταν 10,7% και 8,46%, αντίστοιχα (Εικόνες 16 και 17). Το γεγονός ότι τα



**Εικόνα 15.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τομές όγκων του *in vivo* μοντέλου μελανώματος σε ποντικούς C57BL/6J μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι του CD3 σε μεγέθυνση  $\times 40$ , όπου με καφέ χρώμα απεικονίζονται τα CD3+ T λεμφοκύτταρα. Οι όγκοι αντιστοιχούν σε ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε (Α) PBS (αρνητικός μάρτυρας), (Β) το ανάλογο Α σε δόση 4 µg/ζώο και (Γ) το ανάλογο Α σε δόση 8 µg/ζώο.



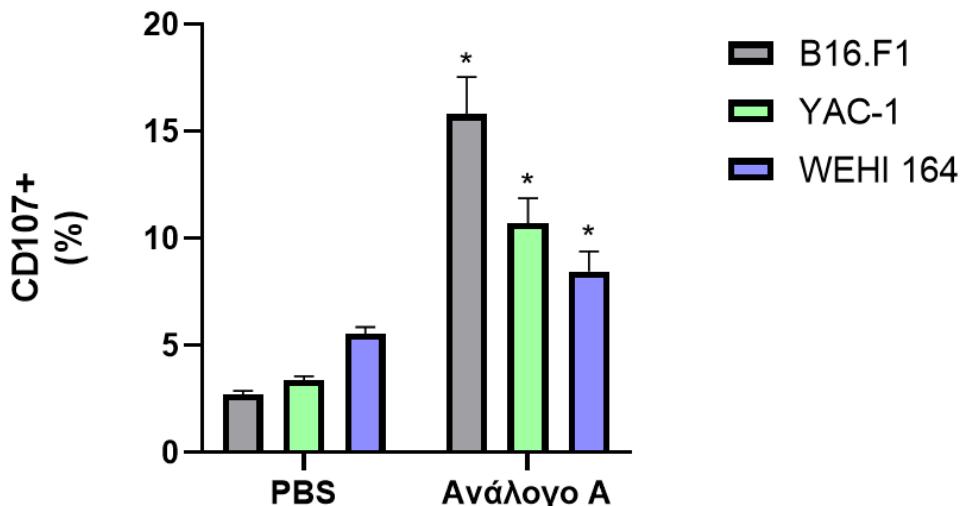
**Εικόνα 16.** Αντιπροσωπευτικά στικτογράμματα του πλάγιου σκεδασμού (SSC, κάθετος άξονας) σε σχέση με την ένταση φθορισμού του σημασμένου αντισώματος έναντι του CD107 (οριζόντιος άξονας), όπως προέκυψαν μετά από ανάλυση σπληνοκυττάρων ποντικών με κυτταρομετρία ροής. Τα σπληνοκύτταρα συνεπωάστηκαν με καρκινικά κύτταρα των σειρών B16.F1 (αριστερά), YAC-1 (μέση) και WEHI 164 (δεξιά). Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν σπληνοκύτταρα ποντικών στους οποίους χορηγήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων (PBS). Οι αριθμοί υποδεικνύουν τα ποσοστά των CD107+ λεμφοκυττάρων (γεγονότα εντός μαύρης περίφραξης) στο σύνολο των σπληνοκυττάρων των ποντικών.

συγγενικά κύτταρα της σειράς B16.F1 προκάλεσαν τη μεγαλύτερη διέγερση των δραστικών κυττάρων υποδεικνύει ότι τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή των όγκων μελανώματος *in vivo*, στοχεύθηκαν από κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα κυρίως ειδικά (CD8+ T κύτταρα) και, σε μικρότερο βαθμό, μη ειδικά (NK και LAK κύτταρα), με αποτέλεσμα τη μείωση των μεγέθους των όγκων

στα ποντίκια που έλαβαν το ανάλογο Α.

## 6. Συμπεράσματα

Η ανάπτυξη ενός νέου φαρμάκου είναι μια πολύ επίπονη, χρονοβόρα και κοστοβόρα διαδικασία. Ο προκλινικός έλεγχος αποτελεί το πρώτο βήμα πριν μια ουσία εισέλθει στις κλινικές μελέτες. Επομένως,



**Εικόνα 17.** Ραβδόγραμμα των ποσοστών των CD107+ λεμφοκυττάρων που ανιχνεύθηκαν μετά από συνεπώαση σπληνοκυττάρων ποντικών με κύτταρα των καρκινικών σειρών B16.F1, YAC-1 και WEHI 164. Απεικονίζονται οι μέσοι όροι και η τυπική απόκλιση από συνολικά 5 ποντίκια/ομάδα, στα οποία χορηγήθηκε *in vivo* ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων (PBS) ή το ανάλογο A. \*, p<0,05.

είναι πολύ σημαντικό το στάδιο αυτό να είναι σωστά δομημένο και να εξετάζει μια πληθώρα παραμέτρων και χαρακτηριστικών, ώστε όταν η ουσία χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες να υπάρχουν αυξημένες πιθανότητες επιτυχίας. Η συγκεκριμένη ανασκόπηση έχει στόχο να παρουσιάσει ορισμένες από τις κυριότερες τεχνικές που εφαρμόζονται *in silico*, *in vitro*, και *in vivo* και να αναδείξει τη λογική πίσω από κάθε δοκιμασία που χρησιμοποιείται.

#### Χρηματοδότηση

Η εργασία υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ – KAINOTOMΩ, συγχρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ) της Ευρωπαϊκής Ένωσης και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ) (κωδικός έργου: T2ΕΔΚ-02423). □

# Biological Assays for the Preclinical Evaluation of New molecules with Anticancer Activity: the Example of Semisynthetic Analogues of Oleuropein

Evangelia Nikou<sup>1\*</sup>, Nikolaos Angelis<sup>1</sup>, Odyssefs Liagkas<sup>1</sup>, Panagiota Papakotsi<sup>2</sup>, Georgia Sarikaki<sup>2</sup>, Efthimios Paronis<sup>1</sup>, Nikolas Orologas-Stavrou<sup>1</sup>, Ioannis Kostopoulos<sup>1</sup>, Pantelis Rousakis<sup>1</sup>, Chrysanthi Panteli<sup>1</sup>, Georgia Dimitrakopoulou<sup>1</sup>, Alexios-Leandros Skaltsounis<sup>2</sup>, Ioannis K. Kostakis<sup>3\*</sup>, Ourania Tsitsilonis<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Flow Cytometry Unit, Section of Animal and Human Physiology, Department of Biology; <sup>2</sup>Department of Pharmacognosy & Natural Products Chemistry, Faculty of Pharmacy; and <sup>3</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis, 15784, Ilissia, Athens, Greece

**KEYWORDS:**

anticancer activity;  
drug development;  
*in silico* testing;  
*in vitro* testing;  
*in vivo* testing

**ABSTRACT**

The toxicity and limited efficacy of many traditional chemotherapeutic formulations has rendered imperative the need to identify new targets and develop novel drugs for the treatment of cancer. The development of new drugs with anticancer activity is a tedious and time-consuming process and requires the combination of a multitude of *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* techniques and clinical trials. The rapid development of computer science provides tremendous potential, and *in silico* programs are widely used for the discovery of new targets. At the same time, *in vitro* assays are used to evaluate the interactions of potential drugs with cells. At the last stage of pre-clinical testing, *in vivo* models are used to study the pharmacokinetics, safety and efficacy of candidate molecules in experimental animals. This review aims to present a series of *in silico*, *in vitro* and *in vivo* methodologies applied during the preclinical testing for the evaluation of the anticancer activity of compounds. The most common *in silico* approaches are presented, as well as assays for testing the cytotoxicity of substances, the type of cell death induced, the degree of changes in cell division and the cell cycle, some *in vivo* models for assessing tumor growth, as well as the *ex vivo* evaluation of the activation of the immune system. Lastly, we briefly present the experimental procedure for the evaluation of the anticancer activity of an oleuropein analogue, including some representative results, conducted in the Flow Cytometry Unit of the Department of Biology in collaboration with the Faculty of Pharmacy of NKUA.

**CORRESPONDING  
AUTHORS:**

Evangelia Nikou  
eunikou@med.uoa.gr  
Ioannis Kostakis  
ikkostakis@pharm.uoa.gr  
Ourania Tsitsilonis  
rtsitsil@biol.uoa.gr

## References

1. Miller K. D., Siegel R. L., Lin C. C., Mariotto A. B., Kramer J. L., Rowland J. H., Stein D. S., Alteri R., Jemal A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA: Cancer J. Clin.* 66, 271–89, 2016.
2. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA: Cancer J. Clin.* 68, 7–30, 2018.
3. Global Cancer Observatory, *Cancer Tomorrow*. [online] 2020, Accessed December 5, 2022. Available from Internet: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype>.
4. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA: Cancer J. Clin.* 66, 7–30, 2016.
5. Schnipper L. E., Davidson N. E., Wollins D. S., Tyne C., Blayney D. W., Blum D., Dicker A. P., Ganz P. A., Hoverman J. R., Langdon R., Lyman G. H., Meropol N. J., Mulvey T., Newcomer L., Peppercorn J., Polite B., Raghavan D., Rossi G., Saltz L., Schrag D., Smith T. J., Yu P. P., Hudis C. A., Schilsky R. L. American Society of Clinical Oncology Statement: A Conceptual Framework to Assess the Value of Cancer Treatment Options. *J. Clin. Oncol.* 33, 2563–77, 2015.
6. Su M., Zhang Q., Bai X., Wu C., Li Y., Mossialos E., Menshah G. A., Masoudi F. A., Lu J., Li X., Salas-Vega S., Zhang A., Lu Y., Nasir K., Krumholz H. M., Jiang L. Availability, cost, and prescription patterns of antihypertensive medications in primary health care in China: a nationwide cross-sectional survey. *Lancet.* 390, 2559–68, 2017.
7. Nosengo N. Can you teach old drugs new tricks? *Nature.* 534, 314–6, 2016.
8. Stone P. (2010). Pharmaceutical Products and Chemical Intermediates. Fourth Review: Advice Concerning the Addition of Certain Products to the Pharmaceutical Appendix to the HTS. *USITC Publication 4181*, pp. 13.
9. Carelle N., Piotto E., Bellanger A., Germanaud J., Thuillier A., Khayat D. Changing patient perceptions of the side effects of cancer chemotherapy. *Cancer.* 95, 155–63, 2002.
10. Zhang Z., Zhou L., Xie N., Nice E. C., Zhang T., Cui Y., Huang C. Overcoming cancer therapeutic bottleneck by drug repurposing. *Sig. Transduct. Target Ther.* 5, 2020.
11. Gordaliza M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin. Transl. Oncol.* 9, 767–76, 2007.
12. Cragg G. M., Grothaus P. G., Newman D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem. Rev.* 109, 3012–43, 2009.
13. Cheng W. H., Cao B., Shang H., Niu C., Zhang L. M., Zhang Z. H., Tian D. L., Zhang S., Chen H., Zou, Z. M. Synthesis and evaluation of novel podophyllotoxin derivatives as potential antitumor agents. *Eur. J. Med. Chem.* 85, 498–507, 2014.
14. Rodrigues F. A., Bomfim I. S., Cavalcanti B. C., Pessoa C. O., Wardell J. L., Wardell S. M. S. V., Pinheiro A. C., Kaiser C. R., Nogueira T. C. M., Low J. N., Gomes L. R., de Souza M. V. Design, synthesis and biological evaluation of (E)-2-(2-arylhydrazinyl) quinoxalines, a promising and potent new class of anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 934–9, 2014.
15. Kataoka T., Shima F. *In Silico Drug Discovery Based on the Identification of a Novel “Druggable” Surface Pockets on the Ras Oncogene Products*. [online] 2013, Accessed March 15, 2022. Available from Internet: [http://www.springer.jp/en/news-publications/press\\_release/2013/130430\\_2/](http://www.springer.jp/en/news-publications/press_release/2013/130430_2/).
16. Brandish P. E., Chiu C. S., Schneeweis J., Brandon N. J., Leech C. L., Kornienko O., Scolnick E. M., Strulovici B., Zheng W. A cell-based ultra-high-throughput screening assay for identifying inhibitors of D-amino acid oxidase. *J. Biomol. Screen.* 11, 481–7, 2006.
17. Segall M. D., Barber C. Addressing toxicity risk when designing and selecting compounds in early drug discovery. *Drug Discov. Today.* 19, 688–93, 2014.

18. Zhang K. Y. J., Milburn M. V., Artis D. R. Scaffold-based Drug Discovery, In: Jhoti H., Leach A. R. eds. *Structure-based Drug Discovery*, The Netherlands, Springer (2007) pp. 129-50.
19. Vidal D., Garcia-Serna R., Mestres J., Ligand-based approaches to in silico pharmacology, chemoinformatics and computational chemical biology. *Springer*. 672, 489–502, 2011.
20. Ezzat A., Wu M., Li X. L., Kwoh C. K. Computational prediction of drug-target interactions using chemogenomic approaches: an empirical survey. *Brief Bioinform.* 20, 1337–57, 2019.
21. Cichonska A., Ravikumar B., Parri E., Timonen S., Pahikkala T., Airola A., Wennerberg K., Rousu J., Aittokallio T. Computational-experimental approach to drug-target interaction mapping: a case study on kinase inhibitors. *PLoS Comput. Biol.* 13, 2017.
22. Agamah F. E., Mazandu G. K., Hassan R., Bope C. D., Thomford N. E., Ghansah A., Chimusa E. R. Computational/in silico methods in drug target and lead prediction. *Brief Bioinform.* 21, 1663–75, 2020.
23. Zheng S., Dharssi S., Wu M., Li J., Lu Z. Text mining for drug discovery. *Method Mol. Biol.* 1939, 231–52, 2019.
24. Rouillard A. D., Gundersen G. W., Fernandez N. F., Wang Z., Monteiro C. D., McDermott M. G., Ma'ayan A. The Harmonizome: a Collection of Processed Datasets Gathered to Serve and Mine Knowledge about Genes and Proteins. *Database*. 2016, 2016.
25. Ochoa D., Hercules A., Carmona M., Suveges D., Gonzalez-Uriarte A., Malangone C., Miranda A., Fumis L., Carvalho-Silva D., Spitzer M. Open Targets Platform: supporting systematic drug-target identification and prioritization. *Nucleic Acids Res.* 49, 1302–10, 2021.
26. Kim S., Chen J., Cheng T., Gindulyte A., He J., He S., Li Q., Shoemaker B. A., Thiessen P. A., Yu B. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Res.* 47, 1102–09, 2019.
27. Norinder U., Bergstrom C. A. Prediction of ADMET properties. *ChemMedChem.* 1, 920–37, 2006.
28. Shaker B., Yu M. S., Lee J., Lee Y., Jung C., Na D. User guide for the discovery of potential drugs via protein structure prediction and ligand docking simulation. *J. Microbiol.* 58, 235–44, 2020.
29. Martin Y. C., Kofron J. L., Traphagen L. M. Do structurally similar molecules have similar biological activity? *J. Med. Chem.* 45, 4350–8, 2002.
30. Kim S., Thiessen P. A., Bolton E. E., Chen J., Fu G., Gindulyte A., Han L., He J., He S., Shoemaker B. A. PubChem substance and compound databases. *Nucleic Acids Res.* 44, 1202–13, 2016.
31. Sterling T., Irwin J. J. ZINC 15-ligand discovery for everyone. *J. Chem. Inf. Model.* 55, 2324–37, 2015.
32. Rogan D. Structure-based approaches to target fishing and ligand profiling. *Mol. Inform.* 29, 176–87, 2010.
33. Shaker B., Ahmad S., Lee J., Jung C., Na D. In silico methods and tools for Drug Discovery. *Comput. Biol. Med.* 137, 2021.
34. Kitchen D. B., Decornez H., Furr J. R., Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 935–49, 2004.
35. Combs A. P. Structure-based drug design of new leads for phosphatase research. *IDrugs.* 10, 112–5, 2007.
36. Coumar M. S., Leou J. S., Shukla P., Wu J. S., Dixit A. K., Lin W. H., Chang C. Y., Lien T. W., Tan U. K., Chen C. H. Structure-based drug design of novel Aurora kinase A inhibitors: structural basis for potency and specificity. *J. Med. Chem.* 52, 1050–62, 2009.
37. Gohlke H., Klebe G. Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41, 2644–76, 2002.
38. Kuntz I. D., Blaney J. M., Oatley S. J., Langridge R., Ferrin T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J. Mol. Biol.*

- 161, 269–88, 1982.
39. Friesner R. A., Banks J. L., Murphy R. B., Halgren T. A., Klicic J. J., Mainz D. T., Repasky M. P., Knoll E. H., Shelley M., Perry J. K. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. Chem.* 47, 1739–49, 2004.
40. Grant B. J., Lukman S., Hocker H. J., Sayyah J., Brown J. H., McCammon J. A., Gorfe A. A. Novel allosteric sites on Ras for lead generation. *PLoS One.* 6, 2011.
41. Nair P. C., Malde A. K., Drinkwater N., Mark A. E. Missing fragments: detecting cooperative binding in fragment-based drug design. *ACS Med. Chem. Lett.* 3, 322–6, 2012.
42. Venkatesh S., Lipper R. A. Role of the development scientist in compound lead selection and optimization. *J. Pharm. Sci.* 89, 145–54, 2000.
43. Viana Nunes A. M., das Chagas Pereira de Andrade F., Filgueiras L. A., de Carvalho Maia O. A., Cunha R. L. O. R., Rodezno S. V. A., Maia Filho A. L. M., de Amorim Carvalho F. A., Braz D. C., Mendes A. N. preADMET analysis and clinical aspects of dogs treated with the Organotellurium compound RF07: a possible control for canine visceral leishmaniasis? *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 80, 2020.
44. Daina A., Michielin O., Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* 7, 2017.
45. National Cancer Institute, *Cell Lines in the In Vitro Screen*. [online] 2015, Accessed March 15, 2023. Available from Internet: [https://dtp.cancer.gov/discoverydevelopment/nci-60/cell\\_list.htm](https://dtp.cancer.gov/discoverydevelopment/nci-60/cell_list.htm).
46. Riss T. L., Moravec R. A., Niles A. L., Duellman S., Benink H. A., Worzella T. J., Minor L. Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Markossian S. eds. *Assay Guidance Manual* [Online]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences (2004). Available from Internet <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>.
47. Berridge M. V., Tan A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 303, 474–82, 1993.
48. Gerlier D., Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Meth.* 94, 57–63, 1986.
49. Kamiloglu S., Sari G., Ozdal T., Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Front. Nutr.* 1, 332–49, 2020.
50. Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J. T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1107–12, 1990.
51. Vichai V., Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* 1, 1112, 2006.
52. Decker T., Lohmann-Matthes M. L. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J. Immunol. Meth.* 115, 61–9, 1988.
53. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P. D. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* 6, 465–8, 2018.
54. Strehler B. L., McElroy W. D. Assay of adenosine triphosphate. In Colwick S. P., Kaplan N. O. eds *Methods in Enzymology*, New York, Academic Press (1957) 3, 871–3.
55. Hannah R., Beck M., Moravec R., Riss T. CellTiter-Glo<sup>TM</sup> Luminescent cell viability assay: a sensitive and rapid method for determining cell viability. *Promega Cell Notes.* 2, 11–3, 2001.
56. Lowe S. W., Lin A. W. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis.* 21, 485–95, 2000.
57. What is the difference between necrosis and

- apoptosis?* Proteintech Group. [online] 2022, Accessed March 15, 2023. Available from Internet: <https://www.ptglab.com/news/blog/what-is-the-difference-between-necrosis-and-apoptosis>
58. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. (2018), Μοριακή Βιολογία του ΚΥΤΤΑΡΟΥ, Μετάφραση της 6ης Αμερικανικής Έκδοσης, Αθήνα, Εκδόσεις Utopia, pp. 976
59. Taatjes D. J., Sobel B. E., Budd R. C. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochem. Cell Biol.* 129, 33–43, 2008.
60. Bottone M. G., Santin G., Aredia F., Bernocchi G., Pellicciari C., Scovassi, A. I. Morphological features of organelles during apoptosis: an overview. *Cells.* 2, 294–305, 2013.
61. Combs C. A. Fluorescence microscopy: a concise guide to current imaging methods. *Curr. Protoc. Neurosci.*, Chapter 2, Unit 2.1, 2010.
62. Pringle J. R., Preston R. A., Adams A. E., Stearns T., Drubin D. G., Haarer B. K., Jones E. W. Fluorescence microscopy methods for yeast. *Methods Cell Biol.* 31, 357–435, 1989.
63. Renz M. Fluorescence microscopy – A historical and technical perspective. *Cytometry Part A.* 83, 767–9, 2013.
64. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., Stryer, L. (2017), Βιοχημεία, Μετάφραση της 8ης Αμερικανικής Έκδοσης- 3η Ελληνική Έκδοση, Αθήνα, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, pp. 87.
65. Adan A., Alizada G., Kiraz Y., Baran Y., Nalbant, A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 37, 163–76, 2017.
66. Henel G., Schmitz J. L. Basic theory and clinical applications of flow cytometry. *Lab. Med.* 38, 428–36, 2007.
67. Vega-Perez J. M., Palo-Nieto C., Vega-Holm M., Góngora-Vargas P., Calderón-Montañó J. M., Burgos-Morón E., Lopez-Lazaro M., Iglesias-Guerra F. Aziridines from alkenyl-β-D-galactopyranoside derivatives: Stereoselective synthesis and in vitro selective anticancer activity. *Eur. J. Med. Chem.* 70, 380–92, 2013.
68. Pourahmad J., Salimi A. Isolated human peripheral blood mononuclear cell (PBMC), a cost-effective tool for predicting immunosuppressive effects of drugs and xenobiotics. *Iran. J. Pharm. Res.* 14, 979–80, 2015.
69. Samara P., Christoforidou N., Lemus C., Argyropoulou A., Ioannou K., Vougogiannopoulou K., Aligiannis N., Paronis E., Gaboriaud-Kolar N., Tsitsilonis O., Skaltsounis A. L. New semi-synthetic analogs of oleuropein show improved anticancer activity in vitro and in vivo. *Eur. J. Med. Chem.* 137, 11–29, 2017.
70. Workman P., Aboagye E. O., Balkwill F., Balmain A., Bruder G., Chaplin D. J., Double J. A., Everitt J., Farningham D. A. H., Glennie M. J., Kelland L. R., Robinson V., Stratford I. J., Tpzer G. M., Watson S., Wedge S. R., Eccles S. A., An Ad Hoc Committee of the National Cancer Research Institute. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br. J. Cancer.* 102, 1555–77, 2010.
71. House C. D., Hernandez L. F., Annunziata C. M. Recent Technological Advances in Using Mouse Models to Study Ovarian Cancer. *Front. Oncol.* 4, 26, 2014.
72. Κοκκινογένης Ε. Π., Δελή Μ., Παπακωστοπούλου Σ., Κότσαρη Μ., Ζουμπουρλής Π., Γουλιελμάκη Μ., Ζουμπουρλής Β. Ανασκόπηση των εφαρμογών των μοντέλων ποντικών στην έρευνα του καρκίνου. *Arch. Hell. Med.* 38, 166–76, 2021.
73. Brunner K. T., Mauel J., Cerottini J. C., Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology.* 14, 181–96, 1968.
74. Zaritskaya L., Shurin M. R., Sayers T. J., Malyguine A. M. New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity. *Exp. Rev. Vaccines.* 9, 601–16, 2010.
75. Trapani J. A., Smyth M. J. Functional significance

- of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 735-47, 2002.
76. Davis D. M., Dustin M. L., What is the importance of the immunological synapse? *Trends Immunol.* 25, 323-7, 2004.
77. Fridman W. H., Galon J., Pagès F., Tartout E., Sautès-Fridman C., Kroemer G. Prognostic and predictive impact of intra- and peritumoral immune infiltrates. *Cancer Res.* 71, 5601-5, 2011.
78. Fridman W. H., Pagès F., Sautès-Fridman C., Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer.* 12, 298-306, 2012.
79. Fridman W. H., Dieu-Nosjean M. C., Pagès F., Cremer I., Damotte D., Sautès-Fridman C., Galon J. The Immune Microenvironment of Human Tumors: General Significance and Clinical Impact. *Cancer Microenviron.* 6, 117-22, 2013.



# Role of Vitamins and Minerals in Treating Certain Health Conditions: A Review of Current Opinion

Girija S. Singh

Chemistry Department, University of Botswana, Private Bag: 0022, Gaborone, Botswana.

Email: singhgs@ub.ac.bw

## KEYWORDS:

Vitamins; minerals;  
cardio-vascular diseases;  
diabetes; cancer; immune  
system; osteoporosis;  
COVID-19; HIV.

## ARTICLE INFO:

Received: November 10, 2022

Revised: February, 2, 2023

Accepted: March 24, 2023

Available on line: September 4, 2023:

## ABSTRACT

The role of vitamins and minerals is considered of paramount importance in management of human health. The per day dietary requirement of vitamins and minerals have been standardized. The deficiency diseases have also been spelt out. The excess of some of these supplements is also documented to cause health problems. The correct quantity required for human being has always been subject of discussion. The aim of this review article is to present an overview of the latest opinion of experts in the subject area. The review articles and research papers on effects of vitamins and minerals on certain diseases, e.g., cardiovascular disease, cancer, diabetes, weak immune system response, HIV/AIDS, COVID-19, and osteoporosis, were consulted. The present article gives a brief idea about vitamins and mineral, their daily requirement, deficiency diseases and critically examines the current views on effect of vitamins and minerals on health conditions mentioned.

## Corresponding Author:

Girija S. Singh

e-mail: singhgs@ub.ac.bw

## 1. Introduction

### 1.1 Vitamins and minerals

Vitamins and minerals are among highly taken supplements by the human being across the globe.<sup>1,2</sup> The term vitamin ("vita" meaning life and "amine" signif-

ing nitrogenous substances essential for life) was first coined in 1912 by the biochemist Casimir Funk, who is known as father of vitamin therapy.<sup>3,4</sup> Vitamins are organic compounds required in very small quantities for certain body functions that the body cannot synthesize. An exception is Vitamin C which is required in fairly high quantity. Thus, vitamins must be supplied with

diet. The deficiency of vitamins is well known to lead to certain diseases. All vitamins were discovered from 1912 to 1948. The commercial production of vitamins started in 1948.

Minerals occur in soil and water and are absorbed by plants or eaten by animals. Minerals too are extremely important for human health. Human beings get most of the minerals from the diet consisting of plant and animal products or from drinking water.<sup>5</sup> While many of us are familiar with sodium, calcium, potassium, there are other minerals such as trace minerals like zinc, copper, and iodine that are required by body in small amounts. Minerals are important in growth of stronger bones and teeth, controlling the body fluids inside and outside cell, and releasing energy from the food. For example, bone health and hemoglobin level are managed by administration of calcium and iron minerals, respectively. Iodine deficiency is known to cause goiter disease that causes enlargement of thyroid gland. During COVID-19 management vitamin C and mineral zinc were commonly prescribed vitamin and mineral.

## 1.2 A simple classification of vitamins

Earlier nutritional studies have classified vitamins into two groups – water-soluble vitamins and fat-soluble vitamins. Water-soluble vitamins included vitamin B<sub>1</sub> (thiamine), vitamin B<sub>2</sub> (riboflavin), Vitamin B<sub>3</sub> (Niacin), vitamin B<sub>6</sub> (pyridoxin), vitamin B<sub>12</sub>, vitamin H (biotin), folate and pantothenic acid (vitamin B<sub>5</sub>). The

fat-soluble vitamins are vitamin A (β-carotene), vitamin D (calciferol), vitamin E (α-tocopherol) and vitamin K. All water-soluble vitamins except vitamin C and the only fat-soluble vitamin, vitamin K are precursors of coenzymes. The body synthesizes coenzymes from them. Coenzymes are organic molecules that assist enzymes in catalyzing certain reactions that cannot be catalyzed alone by the amino acid side chains of the enzyme.<sup>6</sup> A list of some common coenzymes synthesized from vitamins and the deficiency diseases are listed in Table 1.

## 1.3 Dietary reference intakes (DRI) for vitamins and minerals

The National Academy of Medicine, USA, has developed nutrients reference values called dietary reference intake (DRI) based on deficiency and toxicity of nutrients reported. The DRIs are specific to age, gender, and life stages, and cover over 40 nutrients. The DRIs for common vitamins and minerals are presented in Table 2.

## 1.4 Occurrence, availability and uses

Water-soluble vitamins occur mainly in grains, fruits, vegetables, milk and dairy foods. Fat-soluble vitamins are found mainly dairy foods, vegetable oils, animal fats, liver, and oily fish.<sup>8</sup> Minerals occur in fruits, vegetables, milk, dairy foods, meat, fish, cereals and nuts.<sup>8</sup> Vitamins and minerals, as industrial manufactured

**Table 1.** Vitamins, coenzymes synthesized and deficiency disease in human being.

Vitamin	Coenzyme	Deficiency diseases in human
Vitamin B <sub>3</sub>	NAD <sup>+</sup> , NADH	Pellagra
Vitamin B <sub>2</sub>	FAD, FADH <sub>2</sub>	Skin inflammation
Vitamin B <sub>1</sub>	TPP	Beriberi
Pantothenic acid	CoASH	Paresthesia
Vitamin H	Biotin	Dermatitis
Vitamin B <sub>6</sub>	PLP	Anemia
Vitamin B <sub>12</sub>	Coenzyme B <sub>12</sub>	Pernicious anemia
Folic acid	THF	Megaloblastic anemia
Vitamin K	Vitamin KH <sub>2</sub>	Internal bleeding

supplements can be easily purchased over the counter in pharmacies. There are some reports suggesting that more people in developed countries like USA and UK take vitamins and supplements in comparison to people of middle-income and low-income countries.<sup>9</sup> Also,

the consumption is usually higher in relatively more educated people. Other people take them only when some deficiency disease is diagnosed, and doctor prescribes them. However, the role of vitamins and mineral supplements in healthy people has always been subject

**Table 2.** Recommended Daily Requirement of Vitamins and Minerals for Human Being.

<b>Vitamins (Common Names)</b>	<b>Recommended Dietary Allowance (RDA) or Daily Adequate Intake (DAI)*</b>		<b>Upper Limit</b>
	<b>Women</b>	<b>Men</b>	
Thiamine	1.1 mg	1.2 mg	Not known
Riboflavin	1.1 mg	1.3 mg	Not known
Niacin	14 mg	16 mg	35 mg
Pantothenic acid	5 mg*	5 mg*	Not known
Pyridoxin	Age 19-50: 1.3 mg Age 51+: 1.5 mg	Age 19-50: 1.3 mg Age 51+: 1.7 mg	100 mg
Biotin	30 µg*	30 µg *	Not known
Folate	400 µg	400 µg	1,000 µg
Vitamin B12	2.4 µg	2.4 µg	Not known
Ascorbic acid	75 mg * (+ 35 mg for smokers)	90 mg * (+ 35 mg for smokers)	2,000 mg
Carotene	700 µg (2,333 IU)	900 µg (3,000 IU)	3,000 µg (about 10,000 IU)
Calciferol	Age 19-50: 15 µg (600 IU) Age 51-70: 15 µg (600 IU) Age 71+: 20 µg (800 IU)	Age 19-50: 15 µg (600 IU) Age 51-70: 15 µg (600 IU) Age 71+: 20 µg (800 IU)	100 µg (4,000 IU)
Tocopherol	15 mg	15 mg	1,000 mg
Vitamin K	90 µg *	120 µg *	Not known
<b>Minerals</b>	<b>RDA and DAI*</b>		<b>Upper Limit</b>
	<b>Women</b>	<b>Men</b>	
Calcium	Age 31-50: 1,000 mg Age 51+: 1,200 mg	Age 31-50: 1,000 mg Age 51+: 1,200 mg	2,500 mg
Chloride	Age 19-50: 2.3 grams* Age 51-70: 2.0 grams* Age 71+: 1.8 grams*	Age 19-50: 2.3 grams* Age 51-70: 2.0 grams* Age 71+: 1.8 grams*	Not known
Chromium	Age 31-50: 25 µg * Age 51+: 20 micrograms*	Age 31-50: 35 µg * Age 51+: 30 µg *	Not known
Copper	900 µg	900 µg	10,000 µg
Fluoride	3 mg	4 mg	10 mg

Iodine	150 µg	150 µg	1,100 µg
Iron	Age 31-50: 18 mg Age 51+: 8 mg	Age 31-50: 18 mg Age 51+: 8 mg	45 mg
Magnesium	Age 19-30: 310 mg Age 31-70+: 320 mg	Age 19-30: 400 mg Age 31-70+: 420 mg	350 mg (from supplements)
Manganese	1.8 mg*	2.3 mg*	11 mg
Molybdenum	45 µg	45 µg	2,000 µg
Phosphorus	700 mg	700 mg	Age 19-30: 310 mg Age 31-70+: 320 mg
Potassium	Age 19-30: 310 mg Age 31-70+: 320 mg	Age 19-30: 310 mg Age 31-70+: 320 mg	Not known
Selenium	55 µg	55 µg	400 µg
Sodium	1,500 mg*	1,500 mg*	Not known; however, a chronic disease risk reduction intake has been proved.
Phosphorus	8 mg	11 mg	40 mg

\* Denotes Adequate Intake (DAI). An AI is a recommended intake when an RDA can't be determined. RDA is the average daily dietary intake required to provide the sufficient nutrient in 97-98% of healthy people in a particular group according to different stages of life and gender.

of discussion.<sup>9</sup> Evidently, taking supplements will not allow deficiency to occur. The excess water-soluble vitamins are excreted from the body with urine. However, the fat-soluble vitamins may accumulate in the body and can be harmful, causing hypervitaminosis.<sup>10</sup> So, there must be check and balance on their intake. One should not forget a rule of thumb: excess of anything is bad" and this is true in case of vitamins and minerals as well. It should also be kept in mind that supplements are not substitutes of a balanced healthy diet.

## 2. Effect of Vitamins and Minerals on Different Health Conditions

The role of vitamins and minerals in preventing, countering or managing certain health conditions such as cardio-vascular diseases, type-2 diabetes, cancer, HIV/AIDS, COVID-19, immune system response, and osteoporosis, etc. have been studied and reported. Zhang and his colleagues have analyzed the health effects of vitamins and minerals on cardio-vascular diseases, cancer, type-2 diabetes, and osteoporosis.<sup>9</sup> In the following sections, a brief overview of the analysis by

Zhang and coworkers,<sup>9</sup> and of the effects of vitamins and minerals on some other medical conditions such as HIV/AIDS, immune system response and COVID-19 is presented.

### 2.1 Effect on cardio-vascular diseases

The death by cardiovascular diseases is a matter of concern in the USA. It is also becoming very common among youth in India and other developing countries. Benefits of taking vitamins and mineral supplements in preventing the cardiovascular diseases in young healthy people have been studied. The US Preventive Service Task Force (USPSTF) published a review in 2013.<sup>11</sup> After this review, a paper on systematic review of fifteen randomized trials has been published. This review paper concluded that there was no benefit whatsoever of supplements on cardiovascular diseases, mostly among patients with risk factors.<sup>12</sup> Although randomized trials of folic acid, alone or in combination with vitamins B<sub>12</sub> or B<sub>6</sub> led to significant lowering of plasma homocysteine levels, total cardiovascular episodes were not diminished. Another comprehensive

review paper based on a large trial conducted in China has mentioned a lower risk of stroke in combination with supplementation of homocysteine lowering vitamins B.<sup>13</sup> Also, there is no conclusive evidence to advise supplementation with antioxidants for minimizing the cardiovascular risk.<sup>11,14</sup> There was no effect of supplementation with vitamin D (2000 IU/day) as well on its primary endpoint (myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death) in healthy people.<sup>15</sup> A combination of calcium and vitamin D also showed no effect on cardiovascular risk in a large scale trial.<sup>16,17</sup>

## 2.2 Effect on cancer

The evidences available in literature till date do not support effect of vitamins and minerals in preventing occurrence of cancer. Indeed, there are some studies that suggest harmful effects of some supplements on certain types of cancer.<sup>9</sup> Some investigations have been carried out on the possible role of vitamins A, D, E and folic acid on selected types of cancer that are discussed below.

Two randomized trials suggested increased risk of lung cancer among high-risk person on β-carotene supplementation. A study carried out on cancer prevention using α-tocopherol and β-carotene revealed an 18% increase in relative risk among people who smoke randomized to β-carotene (20 mg/day) compared with those who were not supplemented.<sup>18</sup> A trial conducted on β-carotene and retinol efficacy demonstrated that a combination of β-carotene (30 mg/day) and vitamin A as retinol (25 000 IU/day) increased the risk of lung cancer by 28% among smokers and workers having occupational exposure to asbestos.<sup>19</sup> In 2014, the US Preventive Services Task Force (USPSTF) recommended not to use β-carotene or vitamin E for prevention of cancer as there was no enough evidence to assess the net benefit of multivitamins or the use of single- or paired-nutrient supplements.<sup>20</sup>

A multivitamin supplementation is reported to have some benefit for cancer incidence. In pooled analyses of 84 investigations (N = 739 803), multivitamin supplementation significantly reduced the i) cancer occurrence of any type (odds ratio, 0.93 [95% CI, 0.87-0.99]; 4 RCTs [n=48 859]; absolute risk difference (ARD), range

among adequately powered trials, -0.2% to -1.2%) and, ii) incidence of lung cancer (OR, 0.75 [95% CI, 0.58-0.95]; 2 RCTs [n=36 052]; ARD, 0.2%).<sup>21</sup>

Randomized trials could not detect any benefit of supplementation with vitamin D, alone or in combination with calcium, on cancer risk at either high or low doses despite some evidence showing reduction in gross cancer mortality.<sup>22,23,24</sup> In a recent study, Zhang and coworkers observed that vitamin D deficiency aggravated growth and metastasis of prostate cancer in nude mice and transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) mice possibly through promoting epithelial-mesenchymal transition (EMT) in two β-catenin-related mechanisms.<sup>25</sup> A trial conducted on prevention of cancer using vitamin E and selenium demonstrated that supplementation with vitamin E (400 IU/day) led to a 17% increase in prostate cancer risk among men.<sup>26</sup> Maternal folic acid supplementation is reported to lower the risk of neural tube defects. However, high supplementation with folic acid may assist cancer progression, especially in countries doing mandatory fortification with folic acid.<sup>27</sup> Most notably, Cole and coworkers have suggested that supplementation with folic acid at ≥1 mg/day may assist the growth of undiagnosed colorectal adenomas.<sup>28</sup> However, a meta-analysis of eleven randomized trials conducted on fifty thousand individuals demonstrated that the folic acid supplementation had no effect on site-specific cancer risk within the first five years of treatment.<sup>23</sup>

More recently, Mohseni and coworkers have published a review paper on trials conducted for effect of vitamin C and vitamin E on cancer survival.<sup>29</sup> They have covered thirty trials conducted on 38936 patients with different cancers. Although their study supported improvement of survival and progression rates of cancers by vitamins C/E they advocated more high-quality trials with large sample size to confirm their results.

## 2.3 Effect on type-2 diabetes

A major risk factor for type 2 diabetes mellitus is diet. Some investigations carried out on the use of supplements such as vitamins C, E, and β-carotene in reducing the risk of type 2 diabetes are reported in literature. These studies didn't find any effect of these supple-

ments in reducing type-2 diabetes.<sup>30,31</sup> A recent placebo-controlled trial of vitamin D supplementation (4000 IU/day) led to an increase in the serum hydroxyvitamin D concentrations significantly but failed to lower the risk of type 2 diabetes.<sup>32</sup>

A review article published by Valdes-Ramos, et al. mentions that the absorption of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> is reduced by the prolonged use of metformin. Metformin is a biguanide and well known first line drug in management of uncomplicated type 2 diabetes. Thus, people taking metformin for longer time were found deficient in folic acid and vitamin B<sub>12</sub>. Such people need to be administered folic acid and vitamin B<sub>12</sub> regularly.<sup>33</sup>

Vitamins and minerals are well known to improve the glucose metabolism because they are cofactors essential for enzyme functions. Kimball and coworkers have studied the effects of a nutrient intervention program on diabetes status.<sup>34</sup> The study revealed that vitamin D combined with other nutrients led to a lowered risk of progression to diabetes and an enhanced rate of reversion to normoglycemia in high-risk people. The results further suggested that the nutrient supplementation regimes may offer a safe, cheaper and effective means for bringing down the risk of diabetes. However, they suggested further evaluation of this potential using randomized controlled trials.

## 2.4 Effect on immune system

The immune system constitutes a large network of different organs, cells, and proteins. Its function is to protect the body from harmful microorganisms such as bacteria, fungi, and viruses, and toxins (harmful chemicals produced by microbes). Vitamins are long known to influence immune system. The vitamins A, C, D, E, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, and folate, and minerals like copper, iron and zinc play role in immune system response. Even small deficiency of one of these vitamins or minerals may result into impaired immune response.<sup>35</sup> During the last decade, vitamins A and D received particular attention because these vitamins showed unexpected and crucial effects on immune response. Mora et al. have mentioned in their review article that the metabolites of vitamins A and D retinoic acid and 1,25(OH)<sub>2</sub>VD<sub>3</sub>, respectively, were capable of binding to nuclear receptors and exert-

ing potential and specific immunomodulatory effects.<sup>36</sup>

Vitamin and mineral deficiencies are more common in older people that may lead to age-related weaker immune system response. Several studies suggested that supplementation with multi-vitamin and mineral supplements could improve the function of immune system in people aged 55 years and above. This hypothesis has been tested recently by Fantacone and coworkers by a double-blind randomized controlled trial.<sup>37</sup> They administered healthy older people with either a multivitamin and multiminerals (MVM) combination formulated to improve immune response (Redoxonfi VI, Singapore) or an identical, inactive placebo control to take daily for 12 weeks. The group measured their (a) blood mineral and vitamin status (i.e., vitamin C, zinc and vitamin D), (b) immune status (salivary IgA and plasma cytokine/chemokine levels), (c) immune function (i.e., whole blood bacterial killing activity, neutrophil phagocytic activity, and reactive oxygen species production), and (d) self-reported health status, before and after treatment. The MVM supplementation led to an increase in vitamin C and zinc levels in blood and self-reported health-condition without changing measures of immune function or status of vitamin D levels, indicating that healthy older people might benefit from multivitamin and mineral supplementation.

## 2.5 Effect on HIV/AIDS

At the beginning of the 21<sup>st</sup> century approximately forty million people across the globe were infected with HIV and many of them had symptoms of AIDS. People with HIV infection were found deficient in micronutrients particularly in low-income settings probably because their diet was not balanced and deficient in essential vitamins and minerals. Early studies had suggested supplementation with micronutrients as cost-effective immunomodulator intervention that might slow the progression of HIV. Some studies had found that women with HIV infection who took a daily multivitamin were about half as likely to go on to develop AIDS as those who didn't take one. These early findings were reviewed by Singhal and Austin.<sup>38</sup> The vitamin that researchers investigated included vitamins A, B, C, and E. In 2004, Fawzi and coworkers conducted study on 1078 preg-

nant women infected with HIV in Dar es Salaam, Tanzania. This group used a double-blind, placebo-controlled trial, to study the effects of daily supplementation with vitamin A (preformed vitamin A and β-carotene), multivitamins (vitamins B, C, and E), or a combination of both to assess the progression of HIV infection. The survival models were used for this study. Their study showed that the median follow-up regarding survival was five years and eleven months (interquartile range, 46 to 80). They recommended the use of these vitamins before initiating antiretroviral therapy in HIV-infected women.<sup>39</sup>

However, most of the multivitamin research was carried out before antiretroviral therapy (ART) became common. At present, ART is the only reliable therapy for HIV. Markham Heid in his article on WebMD.com writes that newer studies have revealed that, while safe, multivitamins don't have the same benefits among people taking ART or other similar drugs.<sup>40</sup>

Visser and coworkers recently published a study with an objective to assess the effectiveness and safe use of micronutrient supplementation in reducing mortality and HIV-related morbidity of HIV-positive adults (excluding pregnant women). They reviewed the research carried out in between 2010 and 2016 for new randomized controlled trials (RCTs) of micronutrient supplements.<sup>41</sup> RCTs that compared supplements containing either single, dual, or multiple micronutrients with placebo, no treatment, or other supplements were included.

A total of 33 trials in which 10,325 people participated, were conducted. Of these, seventeen trials were new. Ten trials were conducted to compare a daily supplementation with multiple micronutrients to placebo in doses up to 20 times the dietary reference intake.<sup>41</sup> A trial was also conducted to compare a daily standard dose with a daily high dose of multivitamins. Nineteen trials were conducted to compare supplementation with single or dual micronutrients (e.g., vitamins A and D, zinc, and selenium) to placebo, and three trials were conducted to compare different dosages or combinations of micronutrients.<sup>41</sup>

The analyses of these trials did not reveal consistent clinically significant advantage of routine multiple micronutrient supplementation in people infected with HIV. However, the authors suggested that these find-

ings should not be considered as a reason for not supplementing micronutrient to people infected with HIV, where specific deficiencies are observed or where the person's diet is not balanced healthy diet and does not supply the RDA of vitamins and minerals.

## 2.6 Effect on COVID-19

SARS-CoV-2, the virus identified for causing COVID-19 disease, was first reported to the WHO on 31<sup>st</sup> December 2019. COVID-19 was declared a global pandemic by the WHO on March 11, 2020.<sup>42</sup> There was consensus among medical practitioners to focus on strengthening the immune system of people. Vitamin C was the most prescribed vitamin whereas zinc was the most prescribed mineral.

Speakman et al. have published a review article recently with an objective to analyze clinical trials on the use of vitamins and supplements for the treatment of COVID-19 infections.<sup>43</sup> A total of seven research studies were selected for review. All selected research papers had evaluated the effect of vitamins and supplements for the treatment of COVID-19. Treatment included intravenous and oral administration of vitamin C, oral administration of vitamin D, oral administration of vitamin D/magnesium/vitamin B<sub>12</sub>, oral administration of zinc, oral administration of zinc/ascorbic acid combination, and intravenous administration of α-lipoic acid. There was variation in end points of each investigation, including the Sequential Organ Failure Assessment score, mortality, rate of intensive care unit (ICU) admissions, negativity of COVID-19 tests, oxygen requirements, and symptom burden. The study concluded that the vitamin D offered the most promising result among the vitamins and supplements used as it significantly decreased the oxygen requirements, SARS-CoV-2 RNA test positivity, need for ICU treatment, and mortality in hospitalized patients. Other vitamins and supplements that were investigated had no statistically significant advantage.

## 2.7 Effect on osteoporosis

Calcium and Vitamin D3 are well known supplements to be recommended for managing bone health. In Botswana, many orthopedics recommend 1000 mg/day cal-

cium intake in adults over 50 years of age. Vitamin D3 is recommended if the deficiency is diagnosed by blood test. Usually, a dose of 5000 µg/week for 3-6 months is recommended. However, the research findings on the role of vitamin D and calcium supplementation are inconsistent. A meta-analysis of trials in community of older adults revealed that vitamin D or calcium supplementation had no effect in lowering the risk of hip fracture or total fracture.<sup>44</sup> Another meta-analysis revealed that while vitamin D alone did not lower the risk of fracture, supplementation with a combination of calcium and vitamin D led to reduction in the relative risk of hip fracture by 16% and of all fractures by 6% among older adults.<sup>45</sup> A recent three years trial of 400, 4000, or 10 000 IU vitamin D/day for three years on 311 healthy adults reported that the higher doses led to statistically significant lower radial bone mineral density, indicating potential for harm.<sup>46</sup> However, in the absence of conclusive evidence, it is important to take these supplements to maintain recommended levels.

### 3. Conclusion

In conclusion, vitamins and minerals are impor-

tant supplements but not substitutes of the balanced healthy diet. Older people are at increasing risk of becoming vitamin deficient. The level of vitamins and minerals in such people should be monitored regularly and the minimum recommended levels of vitamins and minerals must be maintained. The results of different studies carried out on the potential of vitamins and minerals in treating or managing certain diseases are not very promising. Vitamins and minerals were observed to have almost no effect on cardiovascular diseases, diabetes, or cancer. Some studies showed that vitamins and minerals improved the functioning of immune system in older people. Earlier studies had indicated the potential of vitamins for treatment of HIV/AIDS but now the antiretroviral therapy is the most beneficial in managing HIV/AIDS. In case of osteoporosis, a meta-analysis led to conclude that the relative risk of hip fracture was decreased by 16% and of all fractures by 6% among elderly people supplemented with a combination of calcium and vitamin D. A higher dose of vitamin D has been indicated to cause potential harm. □

## References

- Ford J. A., MacLennan G.S., Avenell A., Bolland M., Grey A., Witham M. For the RECORD Trial Group. Cardiovascular disease and vitamin D supplementation: trial analysis, systematic review, and meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 100,746-55, 2014. doi:10.3945/ajcn.113.082602
- O'Brien S. K. , Malacova E., Sherriff J. L., Black L. J. The prevalence and predictors of dietary supplement use in the Australian population. *Nutrients* 9, E1154, 2017. doi:10.3390/nu9101154
- Semba R. D. The discovery of the vitamins. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 82(5), 310-5, 2012. doi: 10.1024/0300-9831/a000124
- Piro A., Tagarelli G., Lagonia P., Tagarelli A., Quattrocne A. Casimir Funk: his discovery of the vitamins and their deficiency disorders. *Ann. Nutr. Metab.* 57(2), 85-8, 2010.
- [https://en.wikipedia.org/wiki/Mineral\\_\(nutrient\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Mineral_(nutrient)), accessed on October 1, 2022.
- Bruice, Essential Organic Chemistry
- <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/vitamins>, accessed on September 26, 2022.
- <https://www.nhsinform.scot/healthy-living/food-and-nutrition/eating-well/vitamins-and-minerals>, accessed on December 13, 2022.
- Zhang F. F., Barr S.I., McNulty H., Li D., Health effects of vitamin and mineral supplements. *British Med. J.* 369 m2511, 2020. doi: 101136/bmj.m2511
- Saljoughian M. Hypervitaminosis: a global concern. *US. Pharm.* 46 (10), 47-50, 2021.
- Moyer V. A., US Preventive Services Task Force. Vitamin D and calcium supplementation to prevent fractures in adults: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann. Intern. Med.* 158 (9), 691-96, 2013. doi: 10.7326/0003-4819-158-9-201305070-00603
- Jenkins D. J. A., Spence J. D., Giovannucci E. L., Kim

- Y-I, Josse R, Vieth R, et al. Supplemental vitamins and minerals for CVD prevention and treatment. *J Am Coll Cardiol*. 71, 570-84, 2018. doi:10.1016/j.jacc.2018.04.020
13. Martí-Carvajal A. J., Solà I., Lathyris D., Dayer M. Homocysteine-lowering interventions for preventing cardiovascular events. *Cochrane Database Syst Rev*. 8, CD006612, 2017. doi:10.1002/14651858.CD006612.pub5
14. Sesso H. D., Buring J. E., Christen W. G., Kurth T., Bélanger C., MacFadyen J., et al. Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. *JAMA* 300, 2123-33, 2008. doi:10.1001/jama.2008.600
15. Manson J. E., Cook N.R., Lee I.M., et al, VITAL Research Group. Vitamin D supplements and prevention of cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 380, 33-44, 2019. doi:10.1056/NEJMoa1809944
16. Hsia J., Heiss G., Ren H., Allison M., Dolan N. C., Greenland P., et al. Women's health initiative investigators. Calcium/vitamin D supplementation and cardiovascular events. *Circulation* 115, 846-54, 2007. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.673491
17. Scragg R., Stewart A. W., Waayer D., Lawes C. M. M., Toop L., Sluyter J., et al. Effect of monthly high-dose vitamin D supplementation on cardiovascular disease in the Vitamin D Assessment Study: a randomized clinical trial. *JAMA Cardiol*. 2, 608-16, 2017. doi:10.1001/jamacardio.2017.0175
18. Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med*. 330:1029-35, 1994. doi:10.1056/NEJM199404143301501
19. Omenn G. S., Goodman G. E., Thornquist M. D., et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 334, 1150-5, 1996. doi:10.1056/NEJM199605023341802
20. Moyer V. A., US Preventive Services Task Force. Vitamin, mineral, and multivitamin supplements for the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: US Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*. 160, 558-564, 2014. doi:10.7326/M14-0198
21. O'Connor E. A., Evans C. V., Ivlev I., Rushkin M. C., Thomas R. G., Martin A., et al. Vitamin and mineral supplements for the primary prevention of cardiovascular disease and cancer. *JAMA* 327, 2334-2347, 2022. doi:10.1001/jama.2021.15650
22. Manson J. E., Cook N.R., Lee I.M., et al, VITAL Research Group. Vitamin D supplements and prevention of cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 380, 33-44, 2019. doi:10.1056/NEJMoa1809944
23. Vollset S. E., Clarke R., Lewington S., Ebbing M., Halsey J., Lonn E., et al, B-Vitamin Treatment Trialists' Collaboration. Effects of folic acid supplementation on overall and site-specific cancer incidence during the randomised trials: meta-analyses of data on 50,000 individuals. *Lancet* 381, 1029- 36, 2013. doi:10.1016/S0140-6736(12)62001-7
24. Manson J. E., Bassuk S. S., Buring J. E., VITAL Research Group. Principal results of the vitamin D and omega-3 trial (VITAL) and updated meta-analyses of relevant vitamin D trials. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 198, 105522, 2020. doi:10.1016/j.jsbmb.2019.105522
25. Zhang Z.-H., Liu M. D., Yao K., Xu S., Yu D.-X., Xie D.-D., Xu D.-X., Vitamin D deficiency aggravates growth and metastasis of prostate cancer through promoting EMT in two β-catenin-related mechanisms. *J Nutr Biochem*. 111, 109177, 2023. doi: 10.1016/j.jnutbio.2022.109177
26. Klein E. A., Thompson I. M. Jr, Tangen C. M., Crowley J. J., Lucia M. S., Goodman P. J., et al. Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA* 306, 1549-56, 2011. doi:10.1001/jama.2011.1437
27. Mason J. B. Folate, cancer risk, and the Greek god, Proteus: a tale of two chameleons. *Nutr Rev*. 67, 206-12, 2009. doi:10.1111/j.1753-4887.2009.00190.x
28. Cole B. F., Baron J. A., Sandler R. S., Haile R. W., Ahnen D. J., Bresalier R. S., et al, Polyp Prevention Study Group. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. *JAMA* 297, 2351-9, 2007. doi:10.1001/jama.297.21.2351

29. Mohseni S., Tabatabaei-Malazi O., Ejtahed H.-S., Qorbani M., Azadbakht L., Khashayar P., Larijani B., Effect of vitamins C and E on cancer survival; a systematic review. *DARU J. Pharm. Sci.* 30, 427-441, 2022. doi:10.1007/s40199-022-00451-x
30. Song Y., Cook N. R., Albert C. M., Van Denburgh M., Manson J. E. Effects of vitamins C and E and beta-carotene on the risk of type 2 diabetes in women at high risk of cardiovascular disease: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 90, 429-37, 2009. doi:10.3945/ajcn.2009.27491
31. Seida J. C., Mitri J., Colmers I. N., Majumdar S. R., Davidson M. B., Edwards A. L., et al. Clinical review: Effect of vitamin D3 supplementation on improving glucose homeostasis and preventing diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, 3551-60, 2014. doi:10.1210/jc.2014-2136
32. Pittas A. G., Dawson-Hughes B., Sheehan P., Ware J. H., Knowler W. C., Aroda V. R., et al, D2d Research Group. Vitamin D supplementation and prevention of type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 381, 520-30, 2019. doi:10.1056/NEJMoa1900906
33. Valdés-Ramos R., Guadarrama-Lopez A. L., Martínez-Carrillo B. E., Benítez-Arciniega A. D., Vitamins and type 2 diabetes mellitus *Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug. Targets.* 15, 54–63, 2015. doi: 10.2174/1871530314666141111103217
34. Samantha M., Kimballa, J. C., Emery, H., Lewanczuk, R. Z. Effect of a vitamin and mineral supplementation on glycemic status: Results from a community-based program. *J. Clin. Transl. Endocrinol.*, 10, 28-35, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jcte.2017.11.002>
35. <https://www.medicalnewstoday.com/articles/do-supplements-really-benefit-the-immune-system>
36. Mora J. R., Iwata M., von Andrian U. H., Vitamins effect on the immune system: vitamins A and D take center stage. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 685–98, 2008. doi: 10.1038/nri2378.
37. Fantacone M. L., Lowry M. B., Uesugi S. L., Michels A. J., Choi J., Leonard S. W., The effect of multivitamin mineral supplement on immune function in healthy older adults: a double-blind randomized controlled trial. *Nutrients* 12, 2447, 2020. doi:10.3390/nu12082447
38. Singhal N., Austine J., A clinical review of micronutrients in HIV infection, *J. Int. Assoc. Phys. AIDS Care* 1, 63-75, 2002.
39. Fawzi W. W., Msamanga G. I., Spiegelman D., Wei R., Kapiga S., Villamor E., A randomized trial of multi-vitamin supplements and HIV disease progression and mortality. *N. Engl. J. Med.*, 351, 23-32, 2004 doi: 10.1056/NEJMoa040541
40. Heid M. <https://www.webmd.com/hiv-aids/hiv-vitamins-supplements>, accessed on February 1, 2023.
41. Visser M. E., Durao S., Sinclair D., Irlam J. H., Siegfried N., Micronutrient supplementation in adults with HIV infection, *Cochren Database of Systematic Rev.* 5, CD003650, 2017. doi: 10.1002/14651858.CD003650.pub4
42. Singh G. S. An overview of common chemotherapeutics used in COVID-19 illness from pharmaceutical chemistry point of view. *Pharmakeftiki* 33, 272 – 91, 2021.
43. Speakman L. L., Michienzi S. M., Badowski M. E Vitamins, supplements and COVID-19: a review of currently available evidence *Drugs Context.* 10, 2021-6-2, 2021. doi: 10.7573/dic.2021-6-2
44. Zhao J. G., Zeng X. T., Wang J., Liu L.. Association between calcium or vitamin D supplementation and fracture incidence in community-dwelling older adults: a systematic review and metaanalysis. *JAMA* 318, 2466-82, 2017. doi:10.1001/jama.2017.19344
45. Yao P., Bennett D., Mafham M., et al. Vitamin D and calcium for the prevention of fracture: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Netw. Open* 2, e1917789, 2019. doi:10.1001/jamanetworkopen.2019.17789
46. Burt L. A., Billington E. O., Rose M. S., Raymond D. A., Hanley D. A., Boyd S. K.. Effect of high-dose vitamin D supplementation on volumetric bone density and bone strength: a randomized clinical trial. *JAMA* 322, 736-45, 2019. doi:10.1001/jama.2019.11889



# Evaluating Cypriot Pharmacist's Knowledge of Alcohol-Medication Interactions

Glykeria Panayidou<sup>1</sup>, Periklis Charalampous<sup>2</sup>, Michael Petrides<sup>1</sup> and Aliki Peletidi<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Pharmacy Programme, Department of Health Sciences, School of Life and Health Sciences,  
University of Nicosia, 2417, Nicosia, Cyprus

<sup>2</sup>Department of Public Health, Erasmus MC University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands.

<sup>3</sup>School of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, UK

## KEYWORDS:

alcohol abuse, community pharmacist, Cyprus, brief intervention, drinking, alcohol and medication interactions

## ABSTRACT

**Background:** Many medications can interact when taken with alcohol, thereby altering the metabolism and the medication effects. However, pharmacists' knowledge about the alcohol-medication interactions have not yet been studied in the Republic of Cyprus.

**Objective:** Our objective was to examine the pharmacists' knowledge on possible alcohol-medication interactions and to uncover whether they are able to identify and/or counsel patients who may have high-risk alcohol behaviors.

**Methods:** A self-administered questionnaire was developed, consisting of 37 questions, and distributed to Cypriot community pharmacists of the capital of Cyprus namely, Nicosia. All questions were based on 5-point Likert scale items and collected through electronic response receipts. Three topics were evaluated and critically discussed: (i) Knowledge of community pharmacists about alcohol abuse and ability to counsel; (ii) Knowledge of community pharmacists about alcohol-medication interactions; and (iii) Past experiences of community pharmacists with heavy-alcohol drinkers.

**Results:** A total of 68 Cypriot pharmacists (males: 48.5% vs. females: 51.5%) participated in this study. Most pharmacists (n=44, 64.7%) agreed that they were confident in advising their patients about the harmful use of alcohol consumption. Some pharmacists (n=26, 38.2%) agreed to discuss the current alcohol guidelines with their patients and having the ability to advise them. Around 57% of the pharmacists (n=39/68) suggested to counsel Cypriot patients about the effects of alcohol-medication interactions. The vast majority of Cypriot pharmacists (85.3%) indicated that warfarin when taken with alcohol can cause "Internal haemorrhage".

## ARTICLE INFO:

Received: March 28, 2023

Accepted: April 10, 2023

Available on line: July 28, 2023

## CORRESPONDING AUTHORS:

Aliki Peletidi;

e-mail: peletidi.a@unic.ac.cy

**Conclusion:** This study reports the first results on Cypriot pharmacist's knowledge and views about alcohol-medication interactions. Although most Cypriot pharmacists are aware of most of the interactions, education should be a priority for community pharmacists in Cyprus in order to utilize primary health services.

## Introduction

Older adults often use multiple medications simultaneously, including medications having the potential to interact with alcohol<sup>1-3</sup>. The concurrent use of medication and alcohol is common as more than one in three older adults who take prescriptions are exposed to at least one alcohol interactive medication<sup>4-5</sup>. Community pharmacists are, however, the first point of contact and are considered one of the most trustworthy health-care professionals.

Pharmacists have regular contact with patients having chronic and/or co-morbid conditions, and thus their services on alcohol-medication interactions might be crucial. Therefore, community pharmacists can play an important role in the brief intervention process through provision of alcohol use and/or alcohol-medication services<sup>6-8</sup>. This indicates that community pharmacists can identify individuals who may have risky drinking behaviours as well as they have the knowledge to advice and educate these individuals regarding the harmful alcohol use and/or alcohol-medication interactions. Alarming-ly, studies exploring the knowledge of community pharmacists in alcohol-medication use as well as their potential to offer brief interventions are limited or not yet available for some countries.

In Cyprus - a Europe's high-income country - over the period from 1990 to 2017, the burden of non-communicable diseases remained stable for ischemic heart disease, neoplasms, and diabetes among males and females<sup>9</sup>. The Cypriot population has several characteristics linked with the co-oc-currence of several other chronic conditions. For instance, Cyprus has a high prevalence of smoking, overweight and obese people, hypertension, and alcohol abuse among males and females, respec-

tively<sup>10-14</sup>. Another example is that on diabetes and mental health, Cyprus has a higher disease burden compared to the most European region countries<sup>15</sup>. Driven by the fact that, older adults with co-morbid health conditions have more health needs and re-quire medication attention and that the role of Cypriot pharmacists has been moved towards a more patient-centred approach, it is of great importance to examine pharmacists' knowledge and views on alcohol-medication interactions<sup>16</sup>. Furthermore, we aimed to investigate the current knowledge of Cypriot pharmacists about the alcohol use and al-cohol-medication interactions as well as to uncover whether they are able to identify and counsel pa-tients who may have risky drinking behaviours.

## Methodology

### Data collection instrument

A self-administered questionnaire was developed after an extensive literature review on alcohol-medication interactions and pharmacists' views<sup>17-22</sup>. The final form of the questionnaire consisted of four sections. The first section (16 questions) examined the knowledge as well as involvement of community pharmacists in advising patients with high-risk al-cohol behaviors. The second section (15 questions) examined pharmacists' current knowledge on alco-hol-medication interactions using multiple-choice questions. The third section consisted of two ques-tions: the first examined the pharmacists' ability to support and counsel patients with a previous history on alcohol abuse and the second one examined how often pharmacists encounter those patients. Re-sponses from the first and third section of the ques-tionnaire were received based on the 5-point Likert

scale. The last section of the questionnaire collected demographic information (gender and age) and other data (years of experience, location).

### ***Location and sample***

The list of community pharmacies was found via the official website of the Pharmaceutical Services of the Cypriot Ministry of Health<sup>23</sup>. Thus, the community pharmacies were selected by convenience sampling to include small independent pharmacies across the largest areas belonging in the capital of Cyprus, Nicosia (i.e., Center of Nicosia, Engomi, Ayios Dometios, Lakatamia, Strovolos, Latsia, and Aglantzia). In total, 158 pharmacies were selected from the list and 68 pharmacies were considered as the final sample of this study.

### ***Pilot study***

After ethics approval by the Pancyprian Pharmaceutical Association, we assessed for content and face validity by sending and/or discussing it with one community pharmacist (AK) and one lecturer (MP) in pharmacy practice from the University of Nicosia, Cyprus. The outcomes of the pilot indicated that the questionnaire was suitable for pharmacy professional, and required some minor amendments of questions. The community pharmacist involved in the pilot was excluded to avoid any type of bias.

### ***Data collection and Analysis***

Pharmacists who responded positively to an online invitation were eligible to participate in this study. Their responses were collected via electronic response receipts. The participation was anonymous and on a voluntary basis. All respondents agreed to participate by submitting a fully complete questionnaire. Additionally, the data analysis was performed using Microsoft Excel. At a first step, demographic data were analyzed using descriptive statistics. At a second step, the 5-point Likert scale items used in each section of the questionnaire were grouped together into a single composite score.

## **Results**

### ***Demographic characteristics***

The demographics of the study population are summarized in Table 1. In total, 68 community pharmacists were participated. Out of these 68 community pharmacists, 35 (51.5%) were females, and the remaining 33 (48.5%) were males. The highest percentage of responses received by pharmacists aged 41-47 (n=15, 22.1%), while the lowest one received by older pharmacists aged 61-65 (n=4, 5.9%), following those aged 66 and above (n=2, 2.9%). The responses received from the selected locations considerably varied, from the highest percentage in the Center of Nicosia (n=26, 38.2%) to the lowest percentage in Ayios Dometios (n=2, 2.9%). Most of the participants (n=14, 20.5%) had 26-30 years of experience (Table 1).

### ***Knowledge of community pharmacists about alcohol abuse and ability to counsel***

Figure 1 shows pharmacists' knowledge about alcohol abuse and their ability to support and counsel. Most community pharmacists, 57.4% (n=39) agreed and 39.7% (n=27) strongly agreed, that they were well informed about alcohol abuse and its damaging consequences. Also, the majority of the community pharmacists (n=44, 64.7%) agreed that they were confident in advising their patients about the harmful use of alcohol consumption. Many of the Cypriot community pharmacists (n=41, 60.3%) showed no opinion to open a dialog with patients having high-risk alcohol behaviors. On the other hand, 41.2% (n=28) agreed that supporting and counseling patients having high-risk alcohol behaviors as well as patients having other health-related issues is part of their daily role as pharmacists. About half of the participants (n=39, 57.4%) agreed on having the courage to refer heavy alcohol drinkers to their general practitioners, whereas some of the participants (n=32, 47.1%) felt comfortable recommending and/or referring their patients to detoxification centers, if needed. Around one in three pharmacists (n=19, 27.9%) disagreed that when meeting heavy alcohol

**Table 1: Demographic characteristics of community pharmacists**

Characteristics	Categories	Frequency (n)	Percentage (%)
Gender	Males	33	48.5
	Females	35	51.5
Age	23-29	8	11.8
	30-35	8	11.8
	36-40	9	13.2
	41-47	15	22.1
	48-54	13	19.1
	55-60	9	13.2
	61-65	4	5.9
	≥ 66	2	2.9
Location	Center of Nicosia	26	38.2
	Engomi	6	8.8
	Ayios Dometios	2	2.9
	Lakatamia	7	10.3
	Strovolos	17	25
	Latsia	4	5.9
	Aglantzia	6	8.8
Years of experience	0-5	11	16.2
	6-10	11	16.2
	11-15	7	10.3
	16-20	8	11.8
	21-25	8	11.8
	26-30	14	20.5
	≥ 31	9	13.2

drinkers in their community pharmacies made them feel uncomfortable. However, some of the pharmacists (n=26, 38.2%) agreed to discuss the current alcohol guidelines with their patients and having the ability to advise, especially those having high-risk

alcohol behaviors.

#### ***Knowledge of community pharmacists about alcohol-medication interactions***

Table 2 shows in detail pharmacists' current

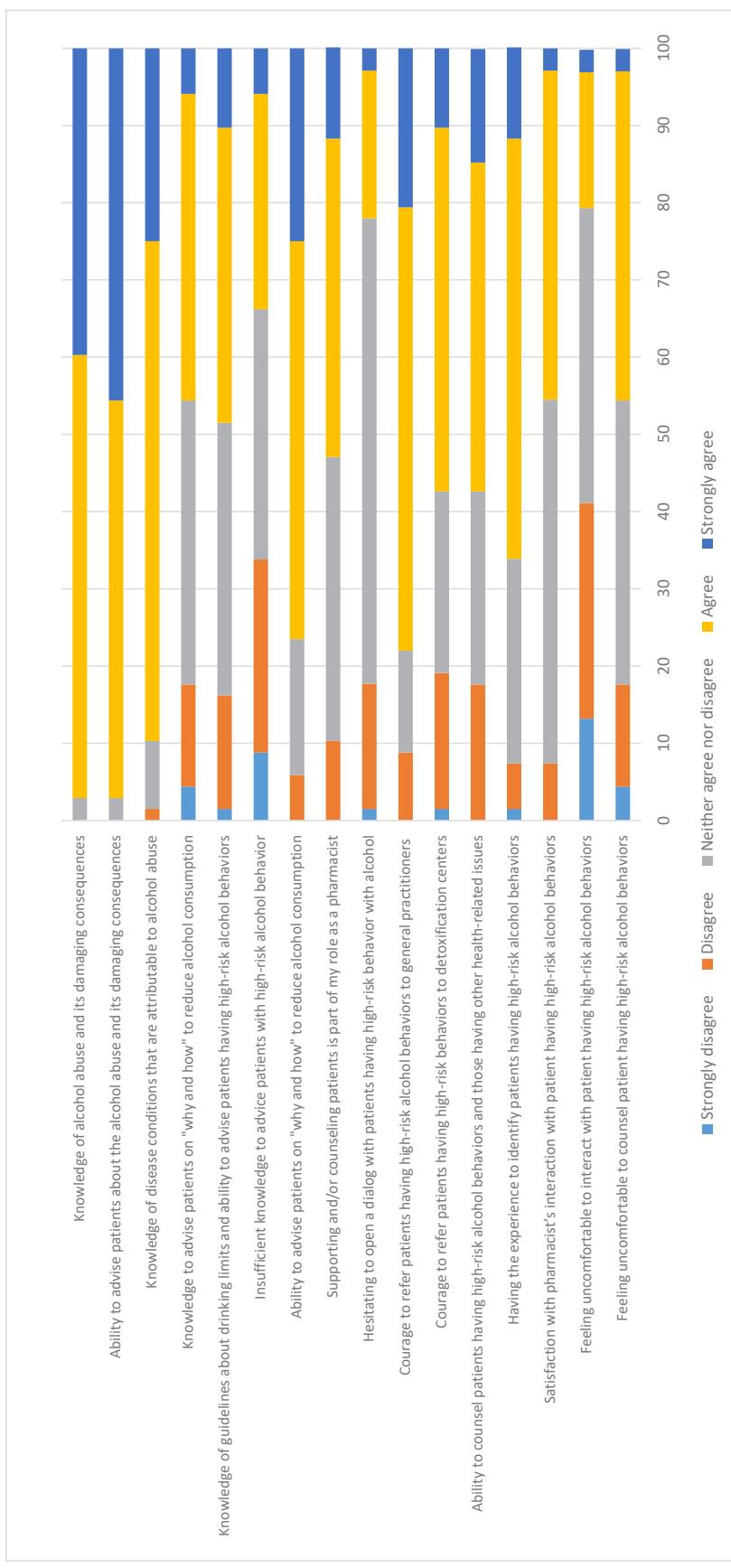
**Figure 1: Knowledge of community pharmacists about alcohol abuse and ability to counsel**

Table 2: Categories of medications examined as regards their harmful interactions resulting from their simultaneous consumption with alcohol

<b>Active substances</b>	<b>Treatment</b>	<b>Responses received from the Cypriot pharmacists</b>
Isosorbide mononitrate & Isosorbide dinitrate	Angina	Correct answer (Dizziness): n=38, 55.9% Other: n=30, 44.1%
Lorazepam & Paroxetine	Stress	Correct answer (Drowsiness): n=56, 82.4% Other: n=12, 17.6%
Warfarin	Blood clots	Correct answer (Internal hemorrhage): n=58, 85.3% Other: n=10, 14.7%
Venlafaxine, Amitriptyline & Escitalopram	Depression	Correct answer (Distress): n=34, 50% Other: n=34, 50%
Metformin	Diabetes	Correct answer (Weakness): n=31, 45.6% Other (e.g., liver damage): n=33, 48.5% Other: n=4, 5.9%
Losartan & Enalapril	Hypertension	Correct answer (Fainting): n=35, 51.5% Other: n=33, 48.5%
Rosuvastatin	Hypercholesterolemia	Correct answer (Liver damage): n=60, 88.2% Other: n=8, 11.8%
Metronidazole	Infections	Correct answer (Tachycardia): n=26, 38% Other (e.g., nausea): n=37, 54.4% Other: n=5, 7.6%
Ibuprofen	Symptomatic relief from mild to moderate pain (e.g., headache, toothache, dysmenorrhea), fever and inflammation	Correct answer (Ulcers): n=59, 86.8% Other: n=9, 13.2%
Paracetamol or Acetaminophen	Symptomatic relief from mild to moderate pain (e.g., joint pain, muscle aches, neuralgia, headache, toothache, period pain) and fever	Correct answer (Headache): n=25, 36.8% Other: n=43, 63.2%

Table 2, continued

Aspirin in low doses	Prevention of cardiovascular diseases	Correct answer (Hemorrhage): n=58, 85.3% Other: n=10, 14.7%
Phenytoin	Epilepsy	Correct answer (Drowsiness): n=21, 30.9% Other: n=47, 69.1%
Zolpidem	Short-term treatment for insomnia	Correct answer (Memory problems): n=46, 67.6% Other: n=22, 32.4%

knowledge on alcohol-medication interactions for a total of 18 active substances. Around half community pharmacists (n=38, 55.9%) indicated that isosorbide mononitrate/dinitrate (i.e., angina medications) cause "Dizziness" when taken with alcohol. Almost all participants (n=56, 82.4%) were aware that lorazepam and paroxetine (i.e., anxiolytic medications) when taken with alcohol interact and cause "Drowsiness". Almost all pharmacists (n=58, 85.3%) indicated that warfarin (i.e., anticoagulant medication) when taken with alcohol can cause "Internal haemorrhage". Also, half of the participants 50% (n=34) stated that venlafaxine, amitriptyline, and escitalopram (i.e., antidepressant medications) can affect the human body causing "Distress" when taken with alcohol.

Although when metformin (i.e., anti-diabetic medication) is taken with alcohol causes "Weakness", most participants (n=33, 48.5%) stated that this interaction can cause "Liver damage", while 45.6% (n=31) placed the correct answer. Also, 51.5% (n=35) of the participants were aware that losartan and enalapril (i.e., antihypertensive medications), interact with alcohol causing "Fainting". The higher percentage of participants (n=60, 88.2%) were aware that rosuvastatin (i.e., medication for hypercholesterolemia) when taken with alcohol causes "Liver damage". Similarly happened with aspirin in low doses (i.e., cardioprotective medication), where 85.3% (n=58) of the participants chose "Haemorrhage" as the correct answer.

Moreover, there was one question regarding

which vitamin's properties are decreased by alcohol consumption, and even though the correct answer was "Folic acid", the highest percentage of community pharmacists (n=47, 69.1%) stated "B12" as the correct answer. With regard to the effects of simultaneous consumption of alcohol-caffeine (please note that, the source of caffeine can be chemical or not), most pharmacists (n=39, 57.4%) stated that this may cause "Insomnia" which was the right choice.

#### ***Past experiences of community pharmacists with heavy-alcohol drinkers***

The first question examined pharmacists' ability to support and counsel patients with a history on alcohol abuse. Most of them (n=39, 57.4%) were not able to express their opinion, thereby responded "Neither bad nor good". Also, 32.4% (n=22) of the pharmacists ranked their knowledge on general alcohol-related questions as "Good", whereas few of them (n=4, 5.9%) ranked their knowledge as "Bad". Also, very few pharmacists (n=2, 2.9%) and (n=1, 1.5%) ranked their knowledge as "Very good" and "Very bad", respectively.

The second question examined how often pharmacists encounter heavy alcohol drinkers in their community pharmacies. In regard to the question on how often the community pharmacists are faced with such cases, almost all participants (n=49, 72.1%) responded "Rarely"; 22.1% (n=15) stated "Sometimes"; and two pharmacists stated "Very often" (n=1, 1.5%) and "Never" (n=1, 1.5%).

## Discussion

This study has provided insights into the knowledge of Cypriot pharmacists concerning alcohol-medication interactions as well as Cypriot pharmacist's ability to counsel patients with high-risk alcohol behaviors. Although most pharmacists are well aware of these interactions, they avoided pointing them out to their patients expressing that may feel uncomfortable and/or cause worries than awareness to their patients. Alarmingly, the vast majority of Cypriot pharmacists stated that informing their patients about the harmful interactions of alcohol-medication use and/or their health effects is part of their daily role.

However, the fact that pharmacists do not often encounter patients with high-risk alcohol behaviors in Cyprus, may render the development of an initial screening and brief intervention on alcohol consumption less realistic. It should be noted that previous health initiatives aiming to expand the role of Cypriot pharmacists have been previously made<sup>24</sup>. Developing motivational interviewing skills, combined with brief interventions and alcohol control, will become the cornerstone of an alcohol brief intervention training program which ought to be implemented by community pharmacies<sup>25-26</sup>. Our findings are comparable with other similar studies. For instance, a study performed by McCaig et al.<sup>17</sup> examining the knowledge, views and confidence level of pharmacists in order to characterize their current level of activity and views on providing alcohol-use related advice in Scotland. Their findings illustrated that pharmacists in Scotland provide little advice on alcohol use, have a reasonable knowledge of recommended limits but lack the knowledge and confidence to provide a health brief primary intervention. Furthermore, a survey conducted by Barnes and Chappell<sup>18</sup> in six urban centres across Canada namely, Vancouver, Edmonton, Saskatoon, Winnipeg, Toronto, and Montreal aimed to examine pharmacists' knowledge of alcohol-medication interactions. Their findings highlighted that community pharmacists

were less knowledgeable compared to hospital pharmacists as they had greater oversight of patient medication administration. This indicates that education concerning alcohol-medication use for community pharmacists is critical and may be useful for future public health calls even though a brief intervention delivered by community pharmacists appears to have had no effect in reducing hazardous or harmful alcohol consumption<sup>8</sup>.

Our research has certain limitations. First despite the fact that in the questionnaire was clearly stated that there was only one correct answer (i.e., alcohol-medication interactions), Cypriot pharmacists chose more than one answer because they faced a dilemma when deciding what would be the correct one. Second, the response rate (43%) and thus, the small sample size can affect our findings which in turn may not be representable for the whole Cypriot pharmacy community. Despite these limitations, this study reports the first findings of pharmacy knowledge and views on alcohol-medication interactions.

## Conclusion

In conclusion, the need for a structured and continuous training system for community pharmacists through the provision of information by the Pancyprian Pharmaceutical Association, in collaboration with the Ministry of Health in Cyprus, will lead to better practices for community pharmacists by properly addressing the management of patients-customers that consume medications and alcohol at the same time. Their advisory role and the service that must be provided by community pharmacists is necessary and essential to ensure healthier outcomes and more informed citizens. In devastation, the promotion and the proper influence of brief innervation will become the key to saving the lives of patients with chronic or even irreversible pathological conditions, and will reduce alcohol and medication related morbidity and mortality rates in the population. □

## References

1. Hovstadius B., Hovstadius K., Åstrand B., Petersson G. Increasing polypharmacy - an individual-based study of the Swedish population 2005–2008. *BMC Clin.Pharmacol.* 10,16 2010.
2. Moriarty F., Hardy C., Bennett K., Smith S.M., Fahay T. Trends and interaction of polypharmacy and potentially inappropriate prescribing in primary care over 15 years in Ireland: A repeated cross-sectional study. *BMJ Open.* 5, e008656, 2015.
3. Weathermon R., Crabb D.W. Alcohol and medication interactions. *Alcohol Res Health.* 23(1), 40-54, 1999.
4. Cousins G., Galvin R., Flood M., Kennedy M.-C., Motterlini N., Henman M.C. et al. Potential for alcohol and drug interactions in older adults: Evidence from the Irish Longitudinal Study on Ageing. *BMC Geriatr.* 14, 57, 2014.
5. Chrischilles E.A., Foley D.J., Wallace R.B., Lemke J.H., Semla T.P., Hanlon J.T. et al. Use of medications by persons 65 and over: Data from the established populations for epidemiologic studies of the elderly. *J.Gerontol.* 47(5) , M137-44, 1992.
6. Dhital R., Coleman R., Day E., Drummond C., Lingford-Hughes A., Marsden J. et al. Service users' views and experiences of alcohol relapse prevention treatment and adherence: New role for pharmacists? *Alcohol and Alcoholism.* 57(5),602-8, 2022.
7. Dhital R., Whittlesea C.M., Norman I.J., Milligan P. Community pharmacy service users' views and perceptions of alcohol screening and brief intervention. *Drug Alcohol Rev.* 29(6), 596-602, 2010.
8. Dhital R., Norman I., Whittlesea C., Murrells T., McCambridge J. The effectiveness of brief alcohol interventions delivered by community pharmacists: Randomized Controlled Trial. *Addiction.* 110(10), 1586–94, 2015.
9. Charalampous P., Pallari E., Tyrovolas S., Middleton N., Economou M., Devleesschauwer B. et al. Burden of non-communicable diseases in cyprus, 1990–2017: Findings from the global burden of disease 2017 study. *Arch.Public Health.* 79(1), 138, 2021.
10. Cyprus: Country Health Profile 2021 [Internet]. Oecd-ilibrary.org. 2022 [cited 16 September 2022]. Available from: [https://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/cyprus-country-health-profile-2021\\_c2fe9d30-en;jsessionid=4uHbeIavgOSZq\\_Ywri-QT6gihadDFSOL9lhYYCnY5.ip-10-240-5-115](https://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/cyprus-country-health-profile-2021_c2fe9d30-en;jsessionid=4uHbeIavgOSZq_Ywri-QT6gihadDFSOL9lhYYCnY5.ip-10-240-5-115)
11. Nicolaou S.A., Heraclides A., Markides K.S., Charalambous A. Prevalence and social determinants of smoking in the adult Greek Cypriot population. *Hippokratia.* 20(4), 284-291, 2016. PMID: 29416301
12. Tobacco Viz [Internet]. Vizhub.healthdata.org. 2022 [cited 16 September 2022]. Available from: <https://vizhub.healthdata.org/tobacco/>
13. Christou V., Karataraki F., Diakonikolaou S., Eid O., Eid R., Styliou T. et al. Assessing the prevalence of hypertension in patients with chronic coronary artery disease in cyprus. *Eur. J. Prev. Cardiol.* 29(Supplement\_1), 2022.
14. Pallari E., Lewison G., Pallari C., Samoutis G., Begum M., Sullivan R. The contribution of Cyprus to non-communicable diseases and biomedical research from 2002 to 2013: implications for evidence-based health policy. *Health Res. Policy and Syst.* 16(1), 82, 2018.
15. Hattingh L., Tait R. Pharmacy-based alcohol-misuse services: current perspectives. *Intgr.Pharm. Res. Pract.* 7,21-31, 2018.
16. McCaig D., Fitzgerald N., Stewart D. Provision of advice on alcohol use in community pharmacy: a cross-sectional survey of pharmacists' practice, knowledge, views and confidence. *Int. J. Pharm. Pract.* 19(3), 171-178, 2011.
17. Barnes G., Chappell N. Pharmacists' knowledge in the area of alcohol, and alcohol and drug interactions. Social Science & Medicine Part A: Medical Psychology & Medical Sociology. 15(5), 649-6571981.

19. Harmful Interactions | National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) [Internet]. Niaaa.nih.gov. 2022 [cited 16 September 2022]. Available from: <https://www.niaaa.nih.gov/publications/brochures-and-fact-sheets/harmful-interactions-mixing-alcohol-with-medicines>
20. Roth J., Bradley K., Thummel K., Veenstra D., Boudreau D. Alcohol misuse, genetics, and major bleeding among warfarin therapy patients in a community setting. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 24(6), 619-627, 2015.
21. Johnson B.A., Seneviratne C. (2014) Alcohol-medical drug interactions in Handbook of Clinical Neurology. Sullivan E.V, Pfefferbaum A. (eds), Elsevier
22. Lenz T. Drug-Alcohol Interactions. *Am. J. Life-style Med.* 7(4), 250-252, 2013 .
23. Pharmaceutical Services | Home Page [Internet]. Moh.gov.cy. 2022 [cited 16 September 2022]. Available from: [https://www.moh.gov.cy/moh/phs/phs.nsf/home\\_en?openform](https://www.moh.gov.cy/moh/phs/phs.nsf/home_en?openform) [https://www.moh.gov.cy/moh/phs/phs.nsf/home\\_en?openform](https://www.moh.gov.cy/moh/phs/phs.nsf/home_en?openform)
24. Charalampous P., Peletidi A. Exploring Cypriot Pharmacists' Perceptions about their Role in Cardiovascular Disease Prevention: A Descriptive Qualitative Study. *J. Res. Pharm. Pract.* 10(1), 23-29, 2021
25. Johnson N., Kypri K., Attia J. Development of an Electronic Alcohol Screening and Brief Intervention Program for Hospital Outpatients With Unhealthy Alcohol Use. *JMIR Research Protocols.* 2(2), e36, 2013.
26. Nilsen P. Brief alcohol intervention-where to from here? Challenges remain for research and practice. *Addiction.* 105(6), 954-959, 2010; .



# Mupirocin-Loaded Niosomal Gel for Topical Wound Healing Application

Srikrishna Theerdhala<sup>1,2\*</sup>, Narayanaswamy Harikrishnan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Dr. M.G.R. Educational and Research Institute, Deemed to be University, Velappanchavadi, Chennai - 600077, Tamil Nadu, India.

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutics, Ratnam Institute of Pharmacy, Pidathapolur (V&P), Muthukur (M), SPSR Nellore (Dt.) - 524346, Andhra Pradesh, India.

<sup>3</sup>Department of Pharmaceutical Analysis, Faculty of Pharmacy, Dr. M.G.R. Educational and Research Institute, Deemed to be University, Velappanchavadi, Chennai - 600077, Tamil Nadu, India.

## KEYWORDS:

Wound healing;  
Nanomedicine;  
Niosomes;  
Mupirocin gel;  
Niosomal gel

## ARTICLE INFO:

February 12, 2023

Revised: April 23, 2023

Accepted: Apr 6, 2023

Available on line: September 4, 2023

## CORRESPONDING AUTHORS:

Srikrishna Theerdhala

Email: srikrishna.nlr@gmail.com

## ABSTRACT

Advanced technology is required to overcome wound healing issues in an improved manner. Mupirocin-loaded niosomal gel has been developed to enhance the drug deposition for a longer period at the targeted site and sustained the rate of release of the drug. Mupirocin is a very efficient antibiotic against a variety of bacteria and pathogens, most often those that cause primary and secondary skin infections. The lipid hydration technique is employed to formulate niosome with polymers (Carbopol and Chitosan) at various concentrations. Those polymers are used in the formulation to sustain the rate of release of the active drug mupirocin and also provide viscosity and non-toxic, biodegradable, and biocompatible properties. Tween 80 is a non-ionic surfactant utilized in the formulation to improve the entrapment efficiency of the drug. Cholesterol is utilized in the formulation to improve vesicle stability and glycerin is a gelling and moistening agent. In addition, to improve the stability of the niosomal gel methylparaben is also added to the current formulation. Fourier transform infrared(FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC) studies are used to find out the compatibility study of the drug and other excipients. The post-evaluation studies confirm that yield percentage lies between 85 - 93%, entrapment efficiency 83 - 97%, drug content lies within the limit of 87 - 98%, pH range matches the skin pH and the obtained range is 6.25 - 7.3. Viscosity and Spreadability show the result within the limit of 410 - 560 cps and 3.8 - 5.4 g cm/s respectively. Post-evaluation study further subjected to in-vitro

diffusion study and formulation F5 has shown best formulation sustain the drug release till 98% at 12h. The formulation F5 has shown better-sustained release of active drug which contains a higher ratio of carbopol and tween 80. It was concluded that a higher concentration of tween 80 increases the entrapment efficiency of active drug in the niosome and carbopol helps to sustain the release rate to an optimum period as a swellable gelling agent.

## 1. Introduction

A general wound can be healed by a natural process of tissue growth but in the case of chronic or non-healing wounds need more attention and effort to heal. In the case of diabetic patients wound healing is very tedious and painful. Wound healing depends upon numerous factors such as blood supply to the wound area, condition of the skin, wounded body parts, types of nutrition intake, etc. Advanced wound care systems replace commercially available medicine and suggest clinicians use nanomedicine for better treatment. In recent years, researchers bring this nano-technology for the improvement of commercially available medicine and bandages. Nano-technology helps to achieve targeted drug delivery, reduce toxicity, and provide better treatment by sustaining the release rate of active drugs<sup>1,2</sup>. In this regard, a unique technology like niosomes has been considered in this current study.

Similar to liposomes, niosomes are multilamellar vesicular structures<sup>3,4</sup> containing nonionic surfactants that can entrap together hydrophilic and hydrophobic, antigens and hormonal drugs<sup>5,6</sup>. Niosome can be prepared by using various types of non-ionic surfactants to form a vesicle to entrap the active drugs in it<sup>7-9</sup>. The drug was loaded to the vesicle at a minimum concentration to produce fewer side effects and stability and modified the release pattern<sup>10</sup>. The non-ionic surfactants and the additive cholesterol together help to form a bilayer membrane and improve drug permeability and solubility<sup>11-13</sup>. Niosome as a carrier protects the drug from unwanted immunological effects, rapid degradation, and in-

stability<sup>14,15</sup>. In addition, it aids in the medication's retention in the targeted location for a longer period and helps the active components' penetration of the skin surface.

Mupirocin is a topical antibiotic used in the treatment of infection. A wide variety of gram-positive and gram-negative bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Haemophilus influenza*, *pasteurella-mutocida*, etc.) can be controlled by mupirocin<sup>16</sup>. Resistance gradually increases by the bacteria toward the active drugs which is a major concern for researchers<sup>17-21</sup>. To increase the therapeutic activity of the active drug nanocarrier has been introduced. Mupirocin-loaded niosomal gels were developed to inhibit the synthesis of RNA and protein of the above-discussed bacteria without any toxic effect on the human body<sup>22,23</sup>. Mupirocin with unique mechanism action is converted to monic acid<sup>20</sup> and excreted through urine once it reached systemic circulation. Also, the mupirocin can kill antibiotic-resistant bacterial strains such as *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)<sup>24</sup>, and the wound healing ability is also related to its capacity to promote re-epithelialization and angiogenesis and stimulate skin and immune cells<sup>25</sup>.

Excipients play an important role in the preparation of nano-gel formulations. Excipients are inactive ingredients that are added to a formulation to enhance its stability, bioavailability, and other properties. In the case of gel and nano-gel preparations, excipients are used to control the rheological properties, increase the viscosity, and improve the drug release characteristics of the formulation. Carbapol is a water-soluble polymer, used as an emulsifying,

stabilizing, suspending, thickening agent, and gelling agent in many industries. Chitosan, as a cationic natural polymer, has been widely used as a topical dressing in wound management owing to its hemostatic, stimulation of healing, antimicrobial, nontoxic, biocompatible, and biodegradable<sup>26</sup> properties. Tween 80 non-ionic surfactants play a major role in the entrapment of drugs and also help stabilize the nanoparticles and improve their dispersion. Cholesterol is used as a membrane additive and acts as a stabilizer as well as a fluidity buffer to improve the stability of the vesicles. Glycerin is used to control the rheological properties of the gel formulations and improve the skin hydration properties of the final product. In addition, preservatives like methylparaben are added to the formulation to prevent bacterial and fungal growth.

In this present study, mupirocin is used as a topical antibiotic loaded with a niosomal carrier for a deeper and better availability of activity to the targeted site. Reports confirm that no study has been reported on the mupirocin-loaded niosomal sustained-release gel. Niosomal gel as a novel formulation enhances patient compliance and acceptance of wound healing treatment.

## 2. Materials and methods

Mupirocin and Carbopol-934 (102.13g/mol) are obtained from Divya associates, Vijayawada, India. Chitosan (medium molecular weight 200-800cps) is obtained from Nice laboratory, India. Tween 80, Cholesterol, and glycerin are obtained from SD fine chemicals India. All other excipients were of analytical research grade and contain the highest purity.

### 2.1. Pre-formulation study of the drug:

The significance of the pre-formulation study is to strengthen the formulation under regulatory guidance and gather enough data to develop a chemically stable product containing a better therapeutic effect. This study also helps to enhance product quality, safety, and standard and minimize toxicity. Regarding the same FTIR and DSC studies have been per-

formed. This result helps to determine the chemical composition and physical state of the drug and polymers used in the formulation.

### 2.2. Preparation of mupirocin-loaded niosome

The lipid hydration method is used for the preparation of multilamellar vesicles of niosome represent in Table.<sup>127</sup> Weight amounts of polymers such as Carbopol and Chitosan at different concentrations have been mixed with an active drug solution prepared with an organic solvent such as methanol. Tween 80, cholesterol was taken in the prescribed ratio in a 250 ml beaker. The mixture was dissolved in diethyl ether and methanol (8:2) solution. The prepared solution is further added slowly into the drug and polymeric solution during stirring. The centrifugation technique has been used to segregate the organic solvent from the prepared sample at room temperature at 8000 rpm. A thin layer of solid mixture deposited at the bottom of the sample holder was collected and hydrated with an aqueous phase with gentle agitation to remove the residue of the organic solvent. The obtained niosome is stored properly for further use.

### 2.3. Preparation of mupirocin-loaded niosomal gel

All ingredients used are based on the formulation mentioned in Table 1. The gel base is composed of glycerin 5% w/w, Methylparaben .22% w/w, and distilled water as a quantity sufficient. Mupirocin-loaded niosome 2% w/w was added to the base of the gel in a stirring condition to obtain a clear and transparent gel<sup>28</sup>.

## 3. Evaluation of mupirocin-loaded niosomal gel

### 3.1. Entrapment efficiency

The UV-Visible spectrophotometer is used to determine the entrapment efficiency of the active drug mupirocin present in niosomal gel. Prepared niosomal gel diluted with 10 ml of methanol kept on a magnetic stirrer with continuous agitation. Obtained

**Table 1.** Formulation of mupirocin-loaded niosomal gel 2% (Net Weight 15g)

Formulation	Drug	CP	CH	TWEEN 80	CL	Glycerine	Methylparaben	Distilled water
<b>F1</b>	2	5	-	4	8	5	0.22	Q.S
<b>F2</b>	2	-	5	4	8	5	0.22	Q.S
<b>F3</b>	2	2	3	5	8	5	0.22	Q.S
<b>F4</b>	2	1	4	6	8	5	0.22	Q.S
<b>F5</b>	2	4	1	6	8	5	0.22	Q.S
<b>F6</b>	2	2	3	3	8	5	0.22	Q.S
<b>F7</b>	2	3	2	3	8	5	0.22	Q.S
<b>F8</b>	2	2.5	2.5	5	8	5	0.22	Q.S

Drug: Mupirocin, CP: Carbopol, CH: Chitosan, CL: Cholesterol, All Values in Percentage

homogeneous solution subjected to a centrifuge for 30 min at 1200 rpm. The supernatant liquid was analyzed at 226 nm under a UV-Visible spectrophotometer with a suitable dilution. The entrapment efficiency percentage was calculated by the formula given below.

### 3.2. Yield Percentage

The yield percentage is used to determine the product result. It has to compare with the raw materials taken for the formulation of niosomal gel. The yield percentage is calculated by the given formula.

#### 3.3. Drug content

Niosomal gel 1 gm dissolved in 50 ml volume of

$$\text{\% Entrapment efficiency} = \frac{\text{Amount of drug entrapped}}{\text{Amount of drug added}} \times 100$$

buffer sample pH 7.4. 1 ml of the above solution was further diluted to 10 ml and the absorbance of the solution was determined by UV-Visible spectropho-

tometer at 226 nm.

### 3.4. Determination of pH

$$\text{\% Percentage yield} = \frac{\text{Practical yield}}{\text{Theoretical yield}} \times 100$$

A digital pH meter is used to determine the pH of the various niosomal formulations. Calibration should be done before use. Each formulation pH was measured in triplicate to get the average. The pH of the formulated niosomal gel should be in the range of 6-7 to avoid unwanted complications in the patient.

### 3.5. Determination of viscosity

The formulated niosomal gel was poured into a beaker and rotated with a Brookfield viscometer at 50 rpm. The corresponding reading was noted which was shown on the viscometer. The viscosity is represented in cps. All the samples are done in

triplicate to minimize the error.

### 3.6. Spreadability

Spreadability is determined for all the formulations. 1 gm of niosomal gel was weight and applied in between the glass plates<sup>29</sup>. After a minute the diameter of the circle formed between two glass plates was measured and the average is taken into consideration.

### 3.7. Scanning electron microscope (SEM) analysis

To determine the surface morphology of the formulated niosomal gel subjected to SEM(Model no. JEOL Model JSM - 6390LV). It also gives additional information about the shape and size of the niosome. A small amount of formulated niosome gel spread on a clear glass stub, visualized under SEM after complete drying of the sample.

### 3.8. In-Vitro release study

An in-vitro drug release study is used to perform to find out the percentage of drug release at a given interval of time. Franz diffusion cell (Model no:KI-2351-6C, volume-20ml) is used to perform the drug release of mupirocin-loaded niosomal gel. From each formulation, 3 mg of freshly prepared niosomal gel was spread on the donor part of the cellulose nitrate membrane (Minipore white cellulose nitrate membrane filter paper, pore size: 0.45μ & 0.22μ). The cellulose membrane is soaked with isopropyl alcohol for overnight to open the pores. In a receptor vessel, 20ml of phosphate buffer (pH-7.4) was kept. The temperature was maintained at 37±0.5°C and the revolution per minute (rpm) was maintained at 400 for 12h. After a regular interval of time, a 5 ml sample was collected and replaced with the same amount of fresh sample to maintain the sink condition. The collected sample after suitable dilution was kept for analysis under a UV Visible spectrophotometer at 226 nm. The obtained result is further used to calculate the percentage of drug release in a particular interval of time.

### 3.9. Drug release kinetic studies

The drug release kinetic study of mupirocin-loaded niosome has been performed using a dissolution profile. The kinetic study was performed for zero order, first order, Higuchi model, and Korsmeyer-Peppas model. The R<sup>2</sup> value also known as the correlation coefficient value indicates the best fitting of the release kinetics of any of the models.

### 3.10. Stability studies

The best formulation F5 was taken for the stability test. The stability test was carried out as per ICH guidelines at 25°C with 60% RH and 40°C with 75% RH for 90 days<sup>30</sup>. Any changes in physical appearance, pH, viscosity, Spreadability, and drug release profile.

## 4. Results and Discussion

### 4.1. Pre-formulation study for all formulations

#### 4.1.1. FTIR study

The drug-polymer combinations were administered, and an agreeableness schedule was followed. This is to ensure that another potentially therapeutically active remedy has not had any physicochemical change after being exposed to the formulation processing processes. This may be used to anticipate the results of subsequent research such as FTIR. Figures 1 and 2 show the FTIR spectra of mupirocin with Carbopol, Chitosan, and other excipients. The characteristic peak of mupirocin bulk appeared at 3471.08, 3304.2 cm<sup>-1</sup> corresponding to OH- stretching 2934.18, 2850.74 cm<sup>-1</sup> CH-stretching 1723.98, 1658.68 cm<sup>-1</sup> belongs to C=O stretching. Similarly, the IR spectrum of mupirocin with carbopol at 3471.08, 3298.04 cm<sup>-1</sup> corresponding to OH-stretching 2928.37, 2844.94 cm<sup>-1</sup> CH-stretching 1718.17, 1652.88 cm<sup>-1</sup> belongs to C=O stretching. Mupirocin with chitosan shows the peak at 3471.08, 3300.58 cm<sup>-1</sup> corresponding to OH-stretching 2928.37, 2848.56 cm<sup>-1</sup> CH-stretching 1721.80, 1656.50 cm<sup>-1</sup> belongs to C=O stretching. Mupirocin with Tween 80 shows the peak at 3471.08, 3304.20 cm<sup>-1</sup> corresponding to OH-stretching 2928.37, 2857.27 cm<sup>-1</sup>

CH-stretching 1723.98, 1652.88 cm<sup>-1</sup> belongs to C=O stretching. Similarly, mupirocin with cholesterol composition shows IR frequencies at 3471.08, 3301.30, cm<sup>-1</sup> corresponding to OH- stretching, 2932, 2859.45 cm<sup>-1</sup> CH-stretching, 1723.98, 1647.07 cm<sup>-1</sup> belongs to C=O stretching. According to the FTIR spectrum analysis report, mupirocin exhibited its distinctive peaks with no shifting or widening when combined with polymers and other excipients. Based on the findings, it is determined that the mupirocin absorption peaks remain unaltered in drug-polymer admixture, indicating that there is no significant interaction.

#### 4.1.2. DSC study

DSC methods had been used to find out about the compatibility of the drug mupirocin, specific polymers (Carbopol, Chitosan), and other excipients. DSC curve of the mupirocin used to be in contrast with 1:1 ratio bodily mixtures. The thermal sphere of the blends i.e. melting point, the absence of an enormous shift in rapid liquefying point, or absence in the result

coming from a new exothermic/endothermic peak in the combination indicated agreeableness in the pure drug and polymers. Moreover, moderate change in the peak shape and width should be an indication of compatibility. DSC curve of pure mupirocin, polymers, excipients, and their mixtures have been represented in Figures 3 & 4.

#### 4.2. Post-formulation study of mupirocin-loaded niosomal gel

##### 4.2.1. Entrapment efficiency of the drug

This study confirms the amount of the drug mupirocin present in the formulated niosomal gel. The main active drug mupirocin concentration should be calculated for each formulation following this study which has shown in Table 2. Obtained results confirm that 83% to 97% of mupirocin is entrapped in various formulations (F1 to F8). The entrapment efficiency and the yield of the niosome depend upon the method chosen and the properties of the drug. The addition

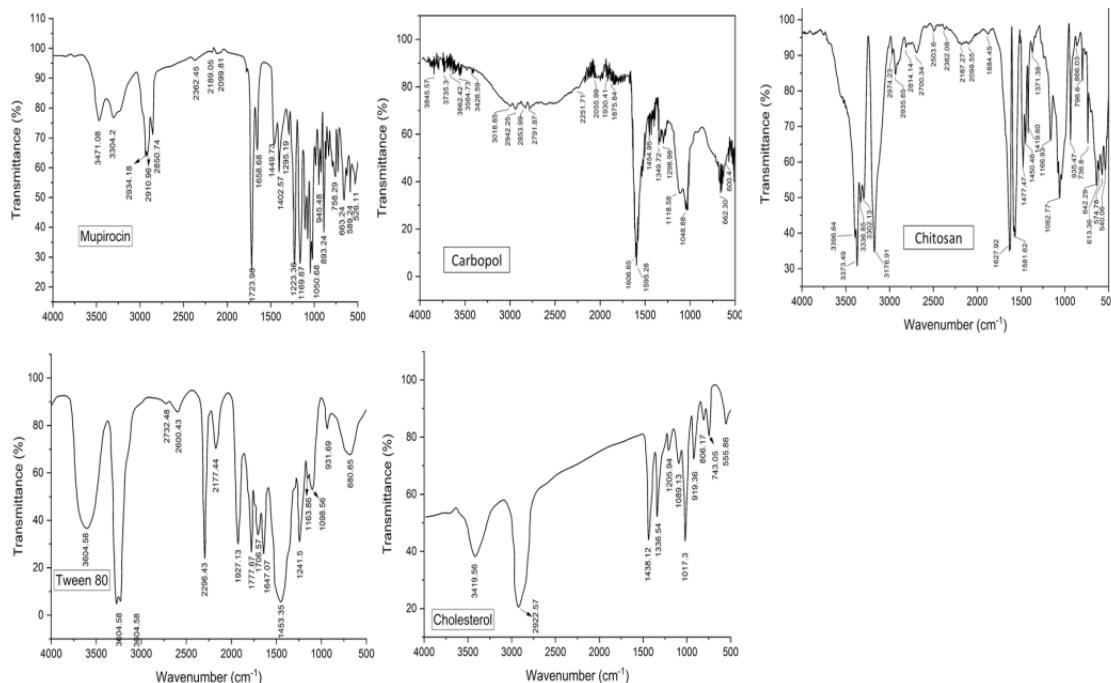
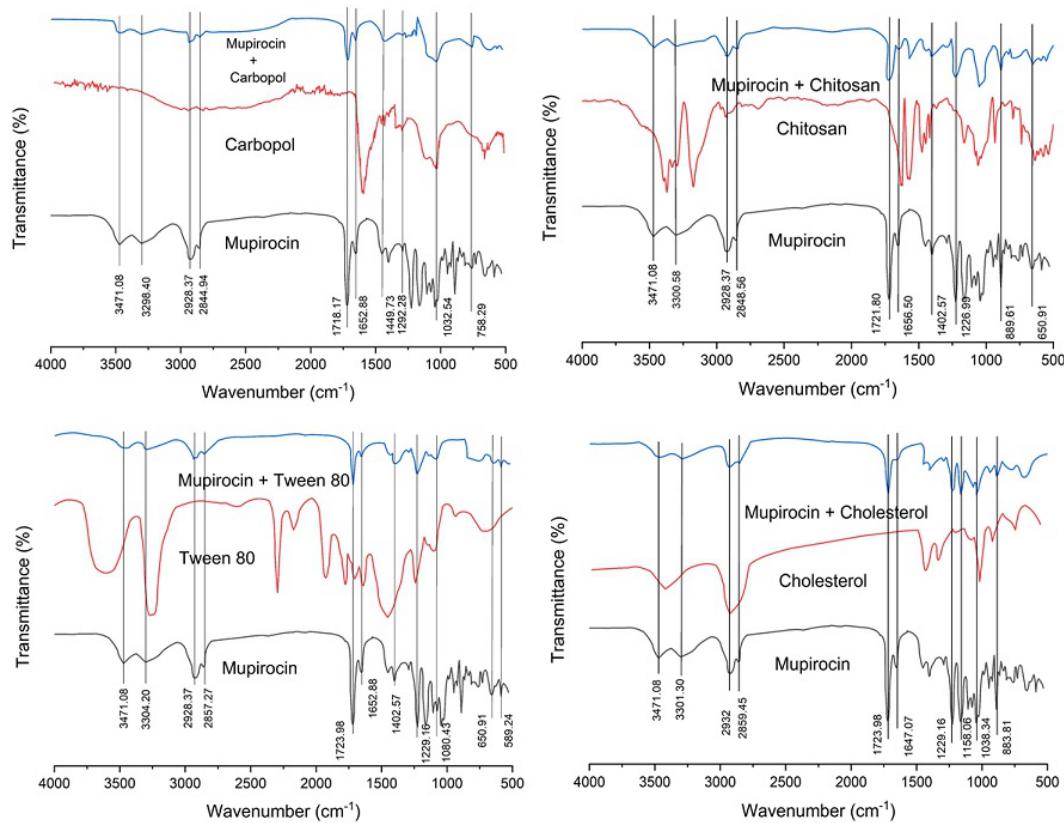
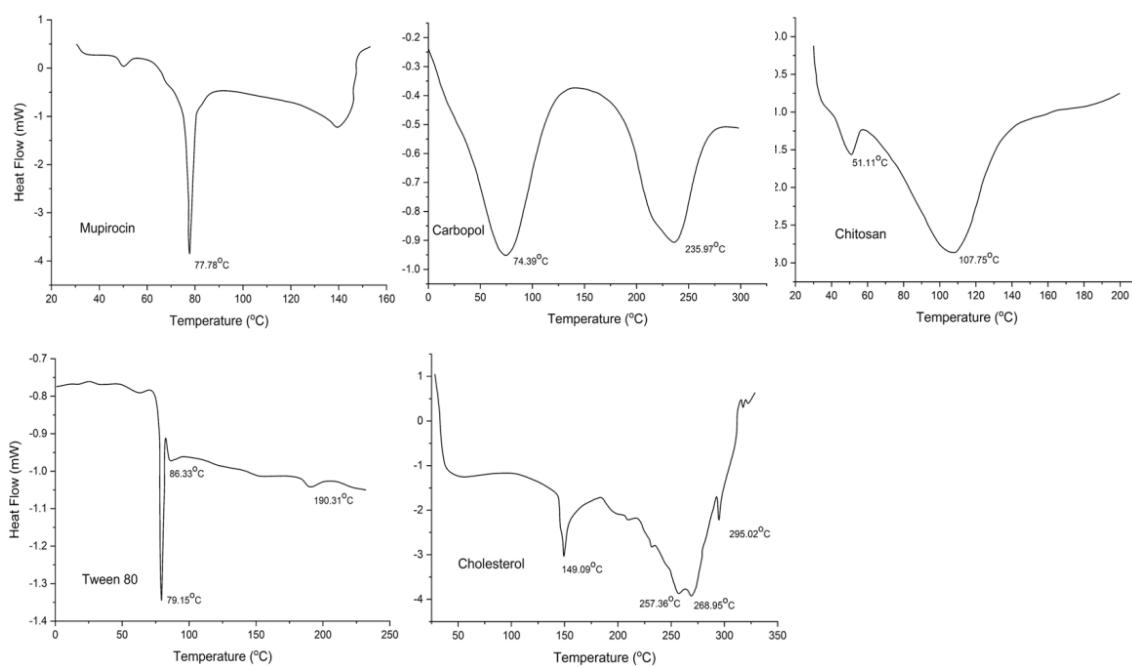
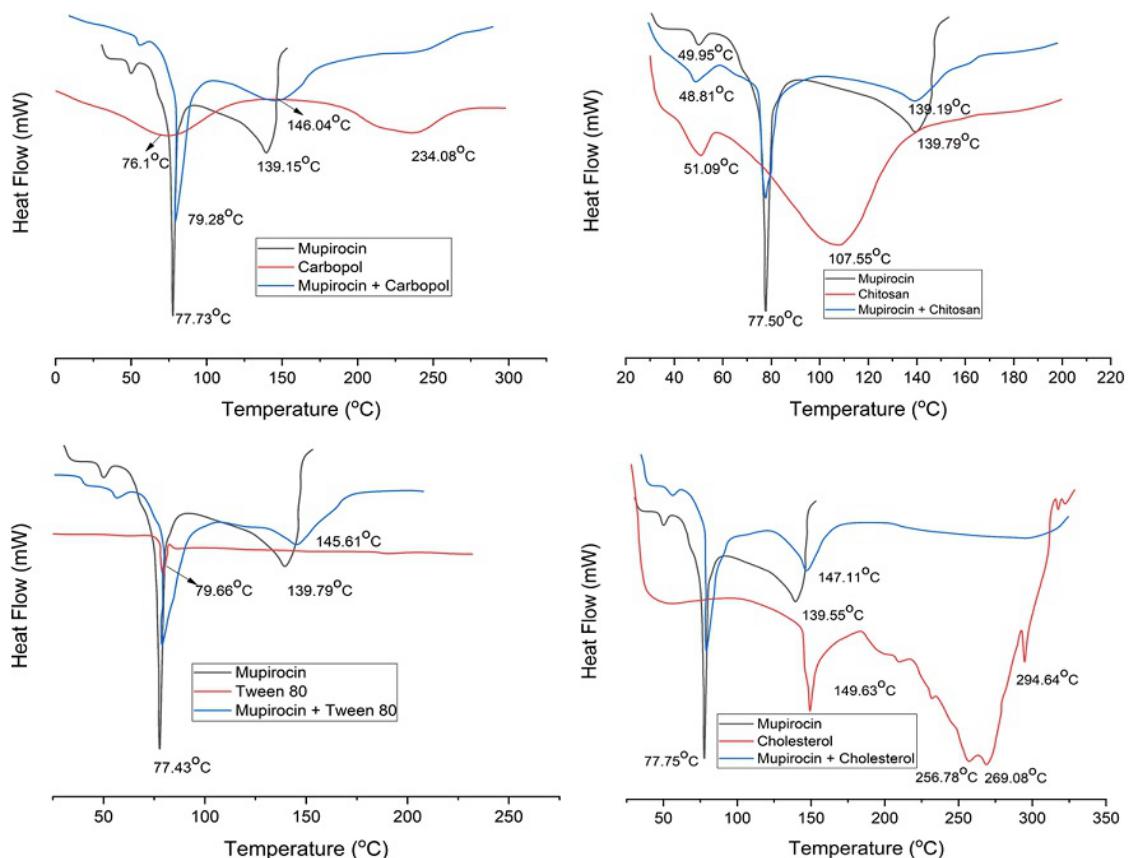


Figure 1. FTIR spectra of pure drug and excipients

**Figure 2.** FTIR Spectra of mupirocin with excipients**Figure 3.** DSC spectra of pure drug and excipients



**Figure 4.** DSC Spectra of mupirocin with excipients

of cholesterol makes the niosomes leak proof<sup>31</sup> and the lipid hydration method enhances the entrapment efficiency of the aqueous phase and permeability. Nonionic surfactants also played an important role in increasing the entrapment efficiency of the drug in the current formulation of niosome<sup>32</sup>.

#### 4.2.2. Yield Percentage

The percentage of yield is fully dependent on practical yield and theoretical yield value. In many cases, it also depends upon the method used in the formulation of niosome. The percentage of yield lies between 85% to 93% represented in Table 2.

#### 4.2.3. Drug content

The drug content was estimated for all the formu-

lations and represented in Table 2. The drug content was found in the range of 87% to 98%. This study confirms that when the concentration of Carbopol and Tween 80 is high it helps to retain more percentage of the drug in the niosomal gel.

#### 4.2.4. Determination of pH

The most important need for a successful topical formulation is skin compatibility. The pH of all formulations of mupirocin-loaded niosome-based gel was determined to be in the range of 6.25–7.3, which corresponds to the skin pH, as indicated in Table 2.

#### 4.2.5. Determination of viscosity

The viscosity for topical drug delivery is very important because with proper viscosity the drug can

remain in the targeted area for a longer time and helps in targeted drug delivery with fewer side effects. Table 2 shows that the viscosity varied between 410 and 560 cps. Formulations F2 and F7 contain low molecular weight and high concentrations of Chitosan. In comparison to other polymers, CH has a low viscosity grade. So the presence of a high concentration of Chitosan brings down the viscosity of the niosomal gel.

#### 4.2.6. Spreadability

The spreading coefficient of a formulation determines its therapeutic efficacy. Table 2 shows that the Spreadability of all formulations containing mupirocin-loaded niosomal gel ranged from 3.8 to 5.4 g. cm/s. The viscosity and gelling properties of the polymers utilized in the formulation influence Spreadability. Formulation F5 has the maximum spreading coefficient of 5.4 g cm/s due

to its viscosity grade of Carbopol polymer, which has shown a viscosity of 560 cps, whereas formulation F2 has a lower spreading coefficient of 3.8 g cm/s due to low viscosity Chitosan polymer such as 410 cps.

#### 4.2.7. SEM analysis

SEM was used to examine the front design and shape of mupirocin-loaded niosomal gel. The smooth surface shown in the photograph confirms the full elimination of the solvent from the formulation, as well as particle sizes ranging from 50 nm to 150 nm. The SEM picture of the best formulation F5 was discovered to be a uniform distribution of niosomes sphere-shaped particles<sup>33</sup>, as shown in Figure 5.

#### 4.2.8. In-Vitrodiffusion study

The dissolving study was carried out in triplicate using the diffusion medium Phosphate buffer with a

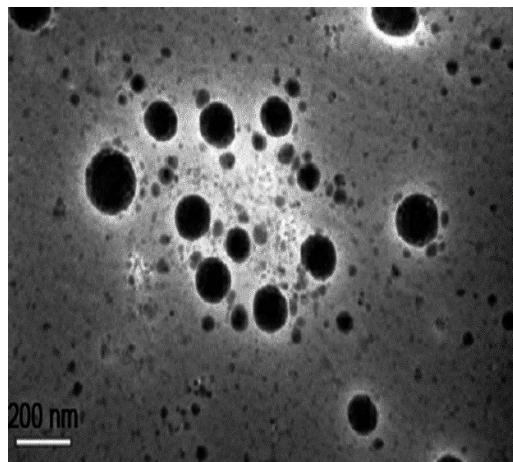
**Table 2.** An evaluation study of mupirocin containing niosomal gel

Formulation	Entrapment efficiency (%)	Yield (%)	Drug content (%)	pH	Viscosity (cps)	Spreadability (g.cm/s)
F1	91.72+0.92	87.52+1.81	93.92+1.01	7.01+0.08	560.07+1.21	5.4+0.17
F2	88.79+1.33	88.21+1.28	94.11+1.37	6.91+0.05	410.15+10.16	4.51+0.36
F3	95.62+1.31	92.01+1.67	95.84+1.17	6.88+0.51	488.07+11.07	4.01+0.83
F4	97.08+1.42	93.11+1.17	97.82+1.07	6.71+0.11	448.16+12.01	3.8+0.11
F5	97.17+1.32	92.61+1.13	98.21+1.33	6.25+0.31	550.81+10.31	4.78+0.26
F6	83.01+1.32	85.11+0.83	89.63+0.17	6.79+0.17	510.02+11.13	4.23+0.77
F7	85.06+1.71	88.95+1.04	87.71+1.04	6.81+0.06	527.84+10.71	5.13+0.07
F8	95.02+1.01	91.81+1.73	96.71+1.18	7.12+0.11	496.17+11.76	4.97+0.12

\*Results are expressed as of mean ±SD (n=3)

pH of 7.4. At the end of 12 hours, the percentage of mupirocin drug release for all formulations of niosomal gel ranged from 92% to 98%. Formulation F1 and F2 contain pure polymer Carbopol and Chitosan and show drug release of 88% at 12 h and 100% at 7

h respectively. Formulations F3 to F8 contain a mixture of different concentrations of polymers with a variable amount of Tween 80. Formulation F3, F4, and F6 contain a high concentration of chitosan and show 99% at 10h, 99% at 8h, and 98% at 10h



**Figure 5.** SEM Image of mupirocin loaded niosomal gel for formulation F5

respectively. Formulation F5 and F7 contain a high concentration of Carbopol and show 98% at 12h and 99% at 10h respectively. Formulation F8 contains an equal concentration of Carbopol and Chitosan and shows 99% drug release at 11h. Formulation F5 achieved maximum sustained drug release till 12h. The maximum release might be caused by polymer concentration and viscosity grade and the presence of a nonionic surfactant in the formulation. A high viscosity grade of polymer or a gelling nature of polymer might be a beneficial attribute for topical formulation to keep the drug molecule for a long period and produce a stable plasma drug concentration. Carbopol has gelling properties and demonstrated more regulated release when compared to Chitosan. When comparing Chitosan to Carbopol, Carbopol has a higher viscosity and gelling properties than Chitosan. Because of the greater viscosity grade, Carbopol did not dissolve quickly, which might be a barrier to an aqueous buffer solution, and can readily maintain the active drug release. In some circumstances, the increased viscosity of Carbopol prevents the active medication from being released completely. According to reports, the presence of surfactant Tween 80 in the formulation enhances the entrapment efficiency of the mupirocin drug in the noisome-based gel. Due to the higher concentration of the drug getting entrapped inside the niosome, it

helps Carbopol to sustain the drug and provide better therapeutic efficacy. Chitosan is a natural and low-viscosity grade polymer that cannot regulate the release rate of mupirocin over an extended length of time. As a result, chitosan-based formulations have less control over mupirocin medication release. It was discovered in a few formulations, that when the concentration of Carbopol and Tween 80 increases, drug release decreases. When the mupirocin release is delayed in the formulation that confirms the presence of Carbopol and Tween 80 at higher concentrations. Table 3 & Figure 6 demonstrate the mupirocin drug release from all noisome-based gel formulations (F1 to F8).

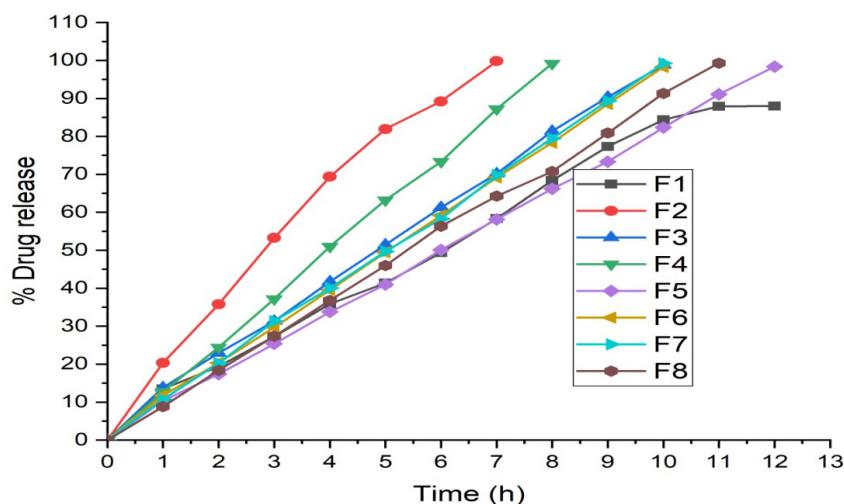
#### 4.2.9. Release kinetic study of a mupirocin - loaded niosome-based gel

The in-vitro dissolving investigations were evaluated using zero-order, first-order, Higuchi, and Peppa's equations to determine the correct system of medical discharge from the formulation. The criteria for selecting the best model were based on the highest  $R^2$  value as the best fit. Table 4 displays the results, the drug release followed by zero-order kinetics, independent of concentration. The illustration data fit into Peppa's equation, which depicted non-fickian release, implying diffusion release and a

**Table 3.** *In-vitro* dissolution of mupirocin-loaded niosomal gel formulations (F1-F8)

Formulation	Time in Hours											
	1hr	2hr	3hr	4hr	5hr	6hr	7hr	8hr	9hr	10hr	11hr	12hr
<b>F1</b>	13.45	19.37	27.31	35.87	41.33	49.37	58.36	68.35	77.31	84.38	87.91	87.98
<b>F2</b>	20.34	35.76	53.26	69.39	81.91	89.21	99.83					
<b>F3</b>	13.83	22.91	31.32	41.72	51.45	61.26	70.18	81.36	90.32	98.81		
<b>F4</b>	12.72	24.41	37.21	50.99	63.21	73.33	87.23	99.21				
<b>F5</b>	10.32	17.37	25.37	33.78	40.98	50.12	58.13	66.17	73.33	82.32	91.09	98.38
<b>F6</b>	11.71	20.31	29.73	39.53	49.45	59.13	69.18	78.36	88.53	98.33		
<b>F7</b>	10.71	20.27	31.32	40.07	49.7	58.26	69.77	79.44	89.34	99.24		
<b>F8</b>	8.82	18.37	27.37	36.78	45.98	56.33	64.29	70.76	80.91	91.32	99.29	

All values in %

**Figure 6.** *In-Vitro* diffusion study of mupirocin-loaded niosomal gel formulation (F1-F8)

mixture of diffusion and erosion release of the niosome-based gel. If the diffusional exponent ( $n$ ) value is less than 0.5, it exhibits fickian diffusion release, and if  $n$  is between 0.5 and 0.89, it exhibits nonfickian (anomalous) behavior, i.e., drug release is regulated by both diffusion and erosion, as shown in niosome formulations F1 to F8.

#### 4.2.10. Stability study

The best formulation F5 was subjected to stability at two different temperatures and relat-

ed humidity by keeping the sample in a stability chamber. Every 0, 30, 60, and 90 days interval mupirocin loaded niosomal gel was evaluated for physical appearance, pH, viscosity, Spreadability, and drug release profile shown in Table 5. Obtained results show no change or minor variation in formulation F5, confirming the stability of the mupirocin-loaded niosomal gel.

#### 5. Conclusion

Treatment of persistent, non-healing ulcerative

**Table 4.** Release kinetics of mupirocin-loaded niosomal gel formulation (F1-F8)

Formulation	R <sup>2</sup> Values					
	Zero-order plots	First-order plots	Higuchi plots	Korsmeyer-peppas plots		Order of release
				R <sup>2</sup>	Diffusional exponent (n)	
<b>F1</b>	0.988	0.950	0.939	0.773	0.839	Diffusion
<b>F2</b>	0.981	0.700	0.958	0.662	0.895	Diffusion
<b>F3</b>	0.998	0.988	0.991	0.759	0.821	Diffusion
<b>F4</b>	0.999	0.715	0.916	0.763	0.899	Diffusion & Erosion
<b>F5</b>	0.991	0.770	0.925	0.992	0.997	Diffusion & Erosion
<b>F6</b>	0.999	0.764	0.920	0.790	0.89	Diffusion & Erosion
<b>F7</b>	0.999	0.702	0.920	0.800	0.873	Diffusion & Erosion
<b>F8</b>	0.999	0.705	0.923	0.833	0.821	Diffusion & Erosion

wounds presents a significant problem for researchers and physicians. Recently, nanotechnology has drawn attention to improving wound healing by slowing medication release, avoiding degradation, and improving tissue regeneration and retention. In this current research mupirocin gel is a topical skin infection treatment made from niosomes. Niosomes could be a good carrier for targeted drug delivery, protect the drug from rapid degradation, and helps the drug retain the targeted area and ease of penetration. FTIR,

DSC study confirms the compatibility study between drug and other excipients. Carbopol a synthetic polymer and chitosan a natural polymer have been taken at different concentrations to formulate a niosomal gel loaded with mupirocin. Tween 80 significantly enhances drug entrapment efficiency. Obtained results confirm that a high concentration of Carbopol and Tween 80 combined sustained the release rate of mupirocin. Chitosan is a natural polymer unable to sustain the drug release up to an optimum period.

**Table 5.** Stability study for Formulation F5

Storage condition	Days	Evaluated parameters				
		physical appearance	pH	viscosity	Spreadability	drug release profile (12h)
25°C/60% RH	0	Clear and transparent	6.22	551.3±.11	4.82+0.41	98.16%
	30	Clear and transparent	6.29	550.7±.09	4.79+0.15	97.75%
	60	Clear and transparent	6.3	552.1±.04	4.68+0.8	98.66%
	90	Clear and transparent	6.21	552.11±.11	4.67+0.93	99.1%
40°C/75% RH	0	Clear and transparent	6.3	550.91±.71	4.71+0.82	98.82%
	30	Clear and transparent	6.26	552.61±.77	4.69+0.43	98.42%
	60	Clear and transparent	6.31	553.1±.71	4.66+0.11	97.96%
	90	Clear and transparent	6.24	550.82±.91	4.64+0.52	99.81%

Results are expressed as of mean ±SD (n=3)

Formulation F5 is considered the best formulation by sustaining the release rate of mupirocin 98% at 12 h. The kinetic release data are the best fit for zero-order release kinetics. Obtained data fit for Korsmeyer-Peppas plots and calculate diffusional exponent (n) value and indicate mupirocin drug release following diffusion and erosion mechanism. The noisome-based mupirocin-loaded gel is considered a better choice of treatment as per conventional dosage form due to prolonging the release rate of the drug, improving patient compliance, and enhancing penetration properties of the drug.

## References

- Priya S.R., Roselin R.B., Karuppiah A., Sankar V. Formulation of mupirocin adsorbed silver nanoparticle with antibiofilm agents for enhancing antibacterial activity. *Ind. J. Pharm. Edu. Res.* 56(1), 50-7, 2022.
- Mehrarya M., Gharehchelou B., Haghghi Poodeh S., Jamshidifar E., Karimifard S., Farasati Far B., Akbarzadeh I., Seifalian A. Niosomal formulation for antibacterial applications. *J. Drug Targeting.* 30(5), 476-93, 2022.
- Cosco D., Paolino D., Muzzalupo R., Celia C., Citraro R., Caponio D., Picci N., Fresta M. Novel PEG-coated niosomes based on bola-surfactant as drug carriers for 5-fluorouracil. *Biomed. Microdevices.* 11(5), 1115-25, 2009.
- Wu T., Zhu C., Wang X., Kong Q., Guo T., He Z., He Y., Ruan S., Ruan H., Pei L., Zhang Y. Cholesterol and phospholipid-free multilamellar niosomes regulate transdermal permeation of a hydrophobic agent potentially administrated for treating diseases in deep hair follicles. *J. Pharm. Sci.* 111(6), 1785-97, 2022.
- Nikam N.R., Patil P.R., Vakhariya R.R., Magdum C.S. Liposomes: A Novel Drug Delivery System: An Overview. *Asian Pharm. Res.* 10(1), 23-8, 2020.
- Naumov A.A., Shatalin Y.V., Potselueva M.M. Effects of A Nano complex Containing Antioxidant, Lipid, and Amino Acid on Thermal Burn Wound Surface. *Bull. Exp. Biol. Med.* 149(1), 62-70, 2010.
- Abdelkader H., Alani A.W., Alany R.G. Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): self-assembly, fabrication, characterization, drug delivery applications, and limitations. *Drug delivery.* 21(2), 87-100, 2014.
- Manosroi A., Wongtrakul P., Manosroi J., Sakai H., Sugawara F., Yuasa M., Abe M. Characterization of vesicles prepared with various non-ionic surfactants mixed with cholesterol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 30, 129-38, 2003.
- Ajrin M., Anjum F. Proniosome: A promising approach for vesicular drug delivery. *Turk. J. Pharm. Sci.* 19(4), 462-475, 2021.
- Rahimpour Y., Hamishehkar H. Niosomes as a carrier in dermal drug delivery. *Recent Adv. Novel Drug Carrier Sys.* 1(1), 141-64, 2012.
- Chen S., Hanning S., Falconer J., Locke M., Wen J. Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): Fabrication, characterization, pharmaceutical and cosmetic applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 144, 18-39, 2019.
- Rajera R., Nagpal K., Singh S.K., Mishra D.N. Niosomes: a controlled and novel drug delivery system. *Biol. Pharm. Bull.* 34(7), 945-53, 2011.
- Yasamineh S., Yasamineh P., Kalajahi H.G., Gholizadeh O., Yekanipour Z., Afkhami H., Eslami M., Kheirkhah A.H., Taghizadeh M., Yazdani Y., Dadashpour M. A state-of-the-art review on the recent advances of niosomes as a targeted drug delivery system. *Int. J. Pharm.* 12(1), 87-98, 2022.
- Barani M., Mirzaei M., Torkzadeh-Mahani M.,

## Acknowledgments

The authors would like to express their gratitude to the administration and Pharma faculty of Dr. M.G.R. Educational and Research Institute, Deemed to be University, Chennai, Tamilnadu, India, and Ratnam Institute of Pharmacy, Nellore, A.P., India for their motivation and encouragement.

## Conflict Of Interest

The authors declared no conflict of interest. □

- Lohrasbi-Nejad A, Nematollahi M.H. A new formulation of hydrophobic-coated niosome as a drug carrier to cancer cells. *Mat. Sci. Eng: C.* 113, 110-122,2020.
15. Mirrezaei N, Yazdian-Robati R, Oroojalian F, Sabekar A, Hashemi M. Recent developments in nano-drug delivery systems loaded by phytochemicals for wound healing. *Mini Rev. Med. Chem.* 20(18), 1867-78,2020.
  16. Gisby J, Bryant J. Efficacy of a new cream formulation of mupirocin: comparison with oral and topical agents in experimental skin infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 44, 255-60, 2000.
  17. Coates A, Hu Y, Bax R, Page C. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1(11), 895-910, 2002.
  18. Poovelikunnel T, Gethin G, Humphreys H. Mupirocin resistance: clinical implications and potential alternatives for the eradication of MRSA. *J. Antimicrob. Chemother.* 70(10), 2681-92,2015.
  19. Minhas M.U, Ahmad S, Khan K.U, Sohail M, Abdullah O, Khalid I, Malik N.S. Synthesis and evaluation of polyethylene glycol-4000-co-poly (AMPS) based hydrogel membranes for controlled release of mupirocin for efficient wound healing. *Current drug delivery.* 19(10), 1102-1115,2022.
  20. Sutherland R, Boon R.J., Griffin K.E., Masters P.J., Slocombe B, White A.R. Antibacterial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use. *Antimicrob Agents Chemother.* 27(4), 495-498,1985.
  21. Thomas C.M., Hothersall J, Willis C.L., Simpson T.J. Resistance to and synthesis of the antibiotic mupirocin. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(4), 281-289,2010.
  22. Pappa K.A. The clinical development of mupirocin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 22(5), 873-879,1990.
  23. Singh A.P, Gaur P.K., Sharma S.K., Gupta D.K. Formulation and characterization of mupirocin gel and evaluation of *in vitro* antimicrobial activity against staphylococcus aureus. *Eur. J. Mol. Clin. Med.* 7(11), 7491-7501,2020.
  24. Mahalakshmi S, Sankar V. In-vitro antibacterial effect of mupirocin in combination with three essential oils against Staphylococcus aureus. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 11(2), 705-709,2020.
  25. Scepankova H, Combarros-Fuertes P, Fresno J.M., Tornadijo M.E., Dias M.S., Pinto C.A., Saraiva J.A., Estevinho L.M. Role of honey in advanced wound care. *Molecules.* 26(16), 4784-92,2021.
  26. Haque S.E, Sheela A. Miscibility of eudragit/chitosan polymer blend in water determined by physical property measurements. *Int.J. Pharm.* 441,648-53,2013.
  27. Ahmad H, Arya A, Agrawal S, Dwivedi A.K. (2017) Novel lipid nanostructures for delivery of natural agents with antioxidant, anti-inflammatory and antistroke potential: perspectives and outcomes. In: Nanostrucures for Oral Medicine. Andronescu E, Grumezescu A.M. (eds) p.p. 577-605. Elsevier Inc.
  28. Singh A.P, Gaur P.K., Sharma S.K., Gupta D.K. Formulation and characterization of mupirocin gel and evaluation of *in vitro* antimicrobial activity against staphylococcus aureus. *Eur. J. Molec. & Clin. Med.* 7(11), 7491-7501,2020.
  29. Sera U.V, Ramana M.V. In vitro skin absorption and drug release—a comparison of four commercial hydrophilic gel preparations for topical use. *The Indian Pharmacist.* 73, 356-60,2006.
  30. Acharya A, Dhakal P, Khadka D. Formulation and Evaluation of Transdermal Gel of Lornoxicam and its Delivery by Passive and Inotophoresis Method: A Comparative Study. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 7(2), 810-18, 2016.
  31. Nematollahi M.H., Pardakhty A, Torkzadeh-Mahanai M, Mehrabani M, Asadikaram G. Changes in physical and chemical properties of niosome membrane induced by cholesterol: a promising approach for niosome bilayer intervention. *RSC Adv.* 7(78), 49463-49472, 2017.
  32. Bhattacharya M, Malinen M.M., Lauren P, Lou Y.R., Kuisma S.W, Kanninen L, Lille M, Corlu A, Guiguen-Guillouzo C, Ikkala O. Nanofibrillar Cellulose Hydrogel Promotes Three-Dimensional Liver Cell Culture. *J. Control Release.* 164(3), 291-298, 2012.
  33. Priprem A, Janpim K, Nualkaew S, Mahakunakorn P. Topical niosome gel of Zingiber cassumunar Roxb. extract for anti-inflammatory activity enhanced skin permeation and stability of compound D. *AAPS Pharmsci Tech.* 17,631-9, 2016.

## In memorial

### Πάρις Μποσκόπουλος

Την Δευτέρα 31 Ιουλίου 2023 έφυγε από κοντά μας ο πολύ αγαπητός συνάδελφος φαρμακοποιός Πάρις Μποσκόπουλος. Ο Πάρις σπούδασε στη Φαρμακευτική Σχολή του ΕΚΠΑ Στην πολυετή σταδιοδρομία του διατέλεσε μεταξύ άλλων διευθυντής Εταιρικών Υποθέσεων στην Pfizer Hellas και μέλος ΔΣ του ΣΦΕΕ. Διετέλεσε επίσης αντιπρόεδρος του Πανελλήνιου Φαρμακευτικού Συνδέσμου και συντονιστής της Ομάδας Κλινικών Μελετών του ΣΦΕΕ. Ιδιαίτερα στην Ελληνική Φαρμακευτική Εταιρεία θα τον θυμόμαστε με αγάπη και συγκίνηση για την τόσο δημιουργική συνεργασία που είχαμε μαζί του όταν επί σειρά ετών ήταν μέλος του Διοικητικού Συμβουλίου της ΕΦΕ. Αντίστοιχα και στην Ελληνική Εταιρεία Φαρμακοχημείας θα θυμόμαστε με σεβασμό τον Πάρι για την ενθάρρυνση και την προθυμία του να στηρίζει σε δύσκολες εποχές την διοργάνωση των επιστημονικών συνεδρίων της Εταιρείας. Γιατί ο Πάρις είχε όραμα για τη Φαρμακευτική Επιστήμη, και πρόσφερε πάντα τις γνώσεις του, το χρόνο του και τις ιδέες του για τα Φαρμακευτικά δρώμενα στον τόπο μας. Ταυτόχρονα έβλεπε πάντα με ευαισθησία θέματα που αφορούσαν τον Πολιτισμό και την Τέχνη. Ο Πάρις ήταν ένας ξεχωριστός, αγαπητός και αξιοπρεπής συνάδελφος. Ευγενικός, πράος και προσιτός, πάντα πρόθυμος να βοηθήσει.. Με την απώλειά του ο φαρμακευτικός κόσμος έμεινε φτωχότερος

Πάρι θα μας λείψεις.....



## Ανακοίνωση του ΔΣ της ΕΦΕ για τον Πάρι Μποσκόπουλο

Το ΔΣ της Ελληνικής Φαρμακευτικής Εταιρείας (ΕΦΕ) εκφράζει την βαθιά του λύπη για την απώλεια του συναδέλφου Πάρι Μποσκόπουλου. Ο Πάρις ήταν ενεργό μέλος του ΔΣ της ΕΦΕ για πολλά χρόνια και η συμβολή του στις δραστηριότητες της επιστημονικής μας εταιρείας ήταν σημαντικές. Με βαθιά γνώση της Φαρμακευτικής επιστήμης και κυρίως του αντικειμένου της ανάπτυξης των φαρμάκων σε βιομηχανικό επίπεδο, βοήθησε με τις πάντοτε ήπιες και νηφάλιες παρεμβάσεις και τις ιδέες του στην εξωστρέφεια της ΕΦΕ.

Ομόφωνα το ΔΣ της ΕΦΕ εκφράζει τα συλλυπητήριά του στην οικογένεια και στους οικείους του εκλιπόντος φίλου και συναδέλφου μας Πάρι Μποσκόπουλου.

Φίλε και συνάδελφε Πάρι, θα σε θυμόμαστε πάντα με αγάπη και θα μας λείπεις πολύ

Ο πρόεδρος και τα μέλη του ΔΣ Ελληνικής Φαρμακευτικής Εταιρείας (ΕΦΕ)

## ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ - MEETINGS

### • SEPTEMBER 4-6, 2023, BELGRADE, SERBIA

IAPC-10 Meeting Physico Chemical Methods in Drug Discovery and Development And ADMET and DMPK

<https://iapchem.org/index.php/iapc-10-home>

### • SEPTEMBER 3-7, 2023 | ZAGREB, CROATIA

IX EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry

<https://www.efmc-asmc.org/>

### • SEPTEMBER 7-8, 2023 | ZAGREB, CROATIA

EFMC-YMCS 2023 10th EFMC Young Medicinal Chemists' Symposium | Anniversary Edition

<https://www.efmc-ymcs.org/>

### • SEPTEMBER 9-13, 2023, VIENNA, AUSTRIA

EANM'23 – 36th Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine

<https://eanm23.eanm.org/>

### • SEPTEMBER 11-13, 2023 RIMINI, ITALY

Summer School on Pharmaceutical Analysis 2023 (SSPA2023)

[www.sspaweb.com](http://sspa.sspaweb.com)

### • SEPTEMBER 17-20, 2023 | CHANIA, CRETE

13th International Conference on Instrumental Methods of Analysis: Modern Trends and Applications, IMA 2023

<http://aclab.web.auth.gr/ima2023/>

### • OCTOBER 7 – 10, 2023 TÜBINGEN, GERMANY

Annual Meeting of the German Pharmaceutical Society (DPhG): Translational Pharmacy – Practice & Perspective

<https://www.dphg.de/vortraege-und-tagungen/dphg-jahrestagung-2023-annual-meeting-copy>

### • NOVEMBER 16-18, 2023 | BASEL, SWITZERLAND.

International Symposium on Chemical Biology (EFMC-ISCB)

<https://www.efmc-iscb.org/>

### • DECEMBER 8, 2023 BRUSSELS, BELGIUM

MedChem 2023

<https://www.medchem.be/>

### • JANUARY 28-FEBRUARY 1, 2024 ST. ANTON, AUSTRIA

4th Alpine Winter Conference on Medicinal and Synthetic Chemistry

<https://www.alpinewinterconference.org/>

### • APRIL 8-11, 2024 UTRECHT, THE NETHERLANDS

EFMC-ACSMEDI Medicinal Chemistry Frontiers