

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

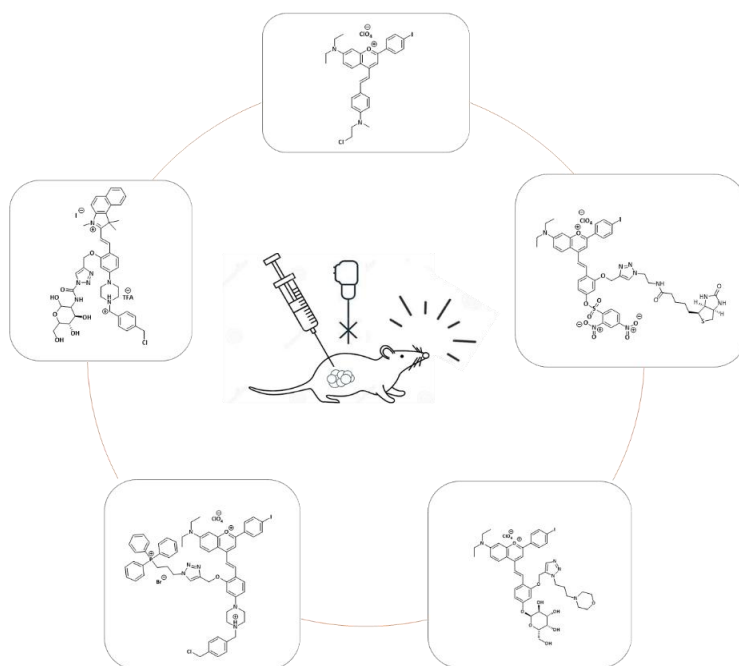
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**«ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ
ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΝΟΝΤΑΙ ΣΕ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΟΥ ΙΞΩΔΟΥΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΕΥΟΥΝ
ΟΡΓΑΝΙΔΙΑ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ» .**



ΚΥΡΚΟΥ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

Εισαγωγή στο Π.Μ.Σ. της κα. Κύρκου Σταυρούλας: 23-10-2020

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: Αναπληρωτής Καθηγητής κος Τζάκος Ανδρέας

Θέμα: «Σχεδιασμός, Σύνθεση και Αξιολόγηση Ενώσεων που Ανταποκρίνονται σε Μεταβολές του Ιξώδους και Στοχεύουν Οργανίδια των Καρκινικών Κυττάρων» .

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 1072/02-12-2022

- 1. Τζάκος Ανδρέας, Αναπληρωτής Καθηγητής**
- 2. Σίσκος Μιχαήλ, Καθηγητής**
- 3. Χριστοφορίδης Σάββας, Καθηγητής**

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διατριβής στις-...-.....

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας, της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Ανδρέα Τζάκου.

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Ανδρέα Τζάκο. Η εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, η πίστη στις δυνατότητες μου και η στήριξη που μου προσέφερε το χρονικό διάστημα της συνεργασίας μας, με τιμά και με χαροποιεί ιδιαίτερα. Τον ευχαριστώ πολύ για την καθοδήγηση, τις συμβουλές και τις γνώσεις που μου προσέφερε. Με παρότρυνε να ασχοληθώ με διαφορετικά και ενδιαφέροντα θέματα δίνοντας μου κίνητρο και ψυχική δύναμη ώστε κάθε φορά να βελτιώνομαι συνεχώς, να κατακτώ τους στόχους μου και να αγαπώ την επιστήμη μου. Τέλος, τον ευχαριστώ επίσης πολύ για την ηθική και υλική υποστήριξη που μου έχει προσφέρει.

Ένα ακόμη θερμό ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω στον κ. Μιχαήλ Σίσκο, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Τον ευχαριστώ που δέχθηκε να αποτελεί μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την πολύ ευχάριστη συνεργασία, την πολύ σημαντική υποστήριξη και τη βοήθεια που μου παρείχε όποτε τη χρειάστηκα, από τα προπτυχιακά ακόμη χρόνια μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Σάββα Χριστοφορίδη, Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, που δέχτηκε να αποτελεί μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου, και για την αξιολόγηση της παρούσας διατριβής. Τον ευχαριστώ επίσης θερμά, για την πολύ ευχάριστη και δημιουργική συνεργασία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Κέντρο NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη βοήθειά του στη λήψη των φασμάτων NMR, το Εμπειρικό Ίδρυμα για την αναβάθμιση της οργανολογικής υποδομής φθορισμομετρίας, και το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίες- ΕΛΙΔΕΚ, σε έργο του οποίου εργάστηκα, στο πλαίσιο της «Πρώτης πρόσκλησης ΕΛΙΔΕΚ για Ερευνητικά έργα με σκοπό την υποστήριξη μελών ΔΕΠ και Ερευνητών και την προμήθεια επιχορήγησης ερευνητικού εξοπλισμού υψηλού κόστους. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες στην ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Ιωάννη Τρουγκάκου, Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ και την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Κωνσταντίνου Κοσμίδη, Τμήμα φυσικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την βοήθεια τους με την βιολογική αξιολόγηση και την πραγματοποίηση πειραμάτων με laser αντίστοιχα.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω στα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας και κυρίως τους: Δημήτρη Διαμαντή, Χρήστο Χατζηγιάννη, Ρένο Βρέττο, Σπύρο Κατσάκο, Βασίλη Γκάλπινο, Θωμά Αντωνίου, Ιωάννη Νικούλη, Βασίλη Μπίστα, Αλέξανδρο-Άσοτ Σαρκισιάν, Ab Majeed Ganai, Παναγιώτα Τσιγάρα, Αντώνη Τσιαϊλάνη, Ανδρονίκη Κωσταγιάννη και Χριστόδουλο Φασούλη. Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω και στα μέλη του Αναλυτικού Κέντρου του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας, την Χαρά-Βασιλική Αναγνώστου και τον Νικόλαο Παρίση. Όλοι τους υπήρξαν όχι μόνο συνεργάτες αλλά και φίλοι. Δημιούργησαν ένα εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας κάνοντας την κάθε μέρα ξεχωριστή. Ιδιαίτερα θα ήθελα πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον διδάκτορα Δημήτριο Διαμαντή και τον υποψήφιο διδάκτορα Χρήστο Χατζηγιάννη για τις πολύτιμες βοήθειες τους, την αδιάκοπη βοήθειά τους όποτε τη χρειάζομαι, τις πρωτοποριακές ιδέες τους, την ανεξάντλητη υπομονή τους και τις μοναδικές συμβουλές τους. Και οι δύο υπήρξαν για εμένα πρότυπα ερευνητών αλλά και ανθρώπων.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στους φίλους μου που έχουν σταθεί δίπλα μου όλον αυτόν τον καιρό. Τους ευχαριστώ για την εμπύχωση σε επαγγελματικό αλλά και σε προσωπικό επίπεδο, για την κατανόηση που έχουν δείξει σε δύσκολες στιγμές, και για την συμμετοχή τους στις χαρές μου.

Το πιο ξεχωριστό ευχαριστώ θα ήθελα να το πω στην οικογένεια μου. Τους γονείς μου, Γρηγόρη και Δώρα, τα αδέρφια μου, Καλλιόπη, Ιωάννα, Ανάργυρο, τις ξεχωριστές μου γιαγιάδες Σταυρούλα και Καλλιόπη. Η αποτύπωση των συναισθημάτων μου για αυτούς τους ανθρώπους σε μερικές σειρές δεν θα μπορούσε παρά να μειώσει την αξία τους. Υπήρξαν για μένα πρότυπα ψυχής και δύναμης. Το πιο δυνατό στήριγμα. Το πιο μεγάλο κίνητρο. Η μεγαλύτερη σχολή. Η μεγαλύτερη αγκαλιά.

*Στα αδέρφια μου,
Καλλιόπη, Ιωάννα, Ανάργυρος*

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	10
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	11
ABSRTACT.....	11
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....	12
1.1 Καρκίνος.....	12
1.2 Χαρακτηριστικά ενεργοποίησης των καρκινικών κυττάρων.....	13
1.2.1 Η διατήρηση της πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης	15
1.2.2 Η αποφυγή της αναστολής της ανάπτυξης	16
1.2.3 Η αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο	16
1.2.4 Η ενεργοποίηση της αναπαραγωγικής αθανασίας	16
1.2.5 Η πρόκληση αγγειογένεσης	17
1.2.6 Ανάπτυξη γενωμικής αστάθειας, η οποία οδηγεί σε δημιουργία τυχαίων μεταλλάξεων.....	18
1.2.7 Η ενεργοποίηση της εισβολής και της μετάστασης	18
1.2.8 Ο επαναπρογραμματισμός του ενεργειακού μεταβολισμού	19
1.2.9 Η αποφυγή της καταστροφής από το ανοσοποιητικό σύστημα.....	19
1.2.10 Η ενεργοποίηση της φαινοτυπικής πλαστικότητας.....	20
1.2.11 Ο επιγενετικός επαναπρογραμματισμός που δεν οφείλεται σε μεταλλάξεις.....	21
1.2.12 Τα πολυμορφικά μικροβιώματα	22
1.2.13 Τα γηρασμένα κύτταρα	22
1.3 Το μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων	24
1.3.1 Υποξικές συνθήκες.....	24
1.3.2 Το φαινόμενο Warburg	26
1.3.3 Το όξινο περιβάλλον	26
1.3.4 Αυξημένη συγκέντρωση δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου	26
1.3.5 Αυξημένη συγκέντρωση γλουταθειόνης	27
1.3.6 Υπερέκφραση ενζύμων	29
1.3.6.1 Οξειδάση θειώδους.....	29
1.3.6.2 β-γαλακτοσιδάση	30
1.3.7 Υπερέκφραση υποδοχέων και μεταφορέων	30
1.3.7.1 Υποδοχέας βιοτίνης.....	31
1.3.7.2 Υποδοχέας γλυκόζης	32
1.3.8 Αύξηση του ιώδους	32

1.3.9 Μείωση της πολικότητας	34
1.3.10 Ανταπόκριση σε μεταβολές της θερμοκρασίας	35
1.4 Διάγνωση του καρκίνου.....	35
1.4.1 Εργαστηριακά δοκίμια	36
1.4.2 Βιοψία	36
1.4.3 Τεχνικές απεικόνισης	36
1.4.3.1 Η αξονική τομογραφία - Computed Tomography- CT Scan.....	36
1.4.3.2 Μαγνητική τομογραφία - Magnetic Resonance Imaging- MRI	37
1.4.3.3 Πυρηνική σάρωση - Nuclear Scan.....	37
1.4.3.4 Σάρωση οστών - Bone Scan.....	37
1.4.3.5 Σάρωση PET - PET Scan.....	37
1.4.3.6 Υπέρηχος – Ultrasound (US).....	37
1.4.3.7 Ακτινογραφίες - X-rays.....	37
1.5 Οπτική μοριακή απεικόνιση	38
1.5.1 Φωτοακουστική απεικόνιση (Photoacoustic Imaging- PAI)	38
1.5.2 Απεικόνιση με ανιχνευτές βασισμένους σε νανοϋλικά	38
1.5.3 Απεικόνιση φωταύγειας- φθορισμού και φωσφορισμού	39
1.6 Απεικόνιση φθορισμού στην περιοχή τους εγγύς υπερύθρου (Near Infrared, NIR)	40
1.6.1 Βασικοί μηχανισμοί μεταφοράς φορτίου	41
1.6.1.2 Φωτοεπαγόμενη μεταφορά ηλεκτρονίων (Photo-Induced Electron Transfer, PET)	43
1.6.2 Βασικοί μηχανισμοί μεταφοράς ενέργειας	43
1.6.2.1 Μεταφορά ενέργειας συντονισμού Förster (Förster Resonance Energy Transfer, FRET)	43
1.6.2.2 Μεταφορά ενέργειας Dexter (Dexter energy transfer, DET).....	44
1.7 Θεραπεία καρκίνου	44
1.7.1 Φωτοθεραπεία	46
1.8 Αρχές Σχεδιασμού που Διέπουν την Ανάπτυξη Θεραπευτικών Αντικαρκινικών Παραγόντων.....	48
1.8.1 Επιλογή του παράγοντα απεικόνισης	48
1.8.1.1 Χρωστικές ημικυανίνης.....	49
1.8.1.2 Χρωστικές άλατος φλαβυλίου	49
1.8.2 Επιλογή του συνδέτη.....	50
1.8.3 Επιλογή του παράγοντα στόχευσης	52
Σκοπός.....	52
Κεφάλαιο 2: Πειραματικό μέρος.....	53

2.1 Υλικά και μέθοδοι	53
2.2 Σχεδιασμός, σύνθεση και αξιολόγηση διαγνωστικής ένωσης που στοχεύει τα καρκινικά κύτταρα μέσω υποδοχών γλυκόζης, της οποίας ο φθορισμός ανταποκρίνεται σε μεταβολές του ιζώδους.....	54
2.2.1 Συνθετική πορεία της διαγνωστικής ένωσης 17	55
Σύνθεση της ένωσης 3	56
Σύνθεση της ένωσης 4	57
Σύνθεση της ένωσης 5	58
Σύνθεση της ένωσης 6	60
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 8	60
Σύνθεση της ένωσης 9	62
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 10	63
Σύνθεση της ένωσης 12	65
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 13	66
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 15	68
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 17	71
2.2.2 Φασματοσκοπικές ιδιότητες και εκλεκτικότητα της ένωσης 17	74
2.3 Σχεδιασμός, σύνθεση και αξιολόγηση θεραπευτικών ενώσεων που στοχεύουν τα μιτοχόνδρια των καρκινικών κυττάρων και ανταποκρίνονται σε μεταβολές του ιζώδους, αυξάνοντας την ένταση φθορισμού τους	84
2.3.1 Συνθετική πορεία της διαγνωστικής ένωσης 25	86
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 20	87
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 21	90
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 23	92
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 25	95
2.3.2 Φασματοσκοπικές ιδιότητες και εκλεκτικότητα της ένωσης 25	97
2.3.3 Συνθετική πορεία της διαγνωστικής ένωσης 32	103
Σύνθεση της ένωσης 26	106
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 27	107
Σύνθεση της ένωσης 29	108
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 30	109
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 32	111
2.2.4 Φασματοσκοπικές ιδιότητες και εκλεκτικότητα της ένωσης 32	114
2.4 Σχεδιασμός, σύνθεση και αξιολόγηση θεραπευτικής ένωσης που εισέρχεται στα καρκινικά κύτταρα μέσω υποδοχέα βιοτίνης, ανταποκρίνεται σε βιοθειόλες και σε μεταβολές του ιζώδους	118
2.4.1 Συνθετική πορεία της διαγνωστικής ένωσης 44	119

Σύνθεση της ένωσης 34	120
Σύνθεση της ένωσης 35	121
Σύνθεση της ένωσης 36	121
Σύνθεση της ένωσης 38	122
Σύνθεση της ένωσης 39	123
Σύνθεση της ένωσης 40	124
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 41	125
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 43	127
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 44	129
2.4.2 Φασματοσκοπικές ιδιότητες και εκλεκτικότητα της ένωσης 44	132
2.5 Σχεδιασμός, σύνθεση και αξιολόγηση θεραπογνωστικής ένωσης που εισέρχεται στα λυσοσώματα των γηρασμένων κυττάρων και ανταποκρίνεται στην β-γαλακτοσιδάση, αυξάνοντας την ένταση φθορισμού της	140
2.5.1 Συνθετική πορεία της διαγνωστικής ένωσης 51	141
Σύνθεση της ένωσης 46	142
Σύνθεση της ένωσης 47	143
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 48	143
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 50	145
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 51	147
2.5.2 Φασματοσκοπικές ιδιότητες και εκλεκτικότητα της ένωσης 51	150
2.5.3 Βιολογική αξιολόγηση της θεραπογνωστικής ένωσης 51	158
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	160
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΚΕΙΜΕΝΟΥ – ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	162
Χαρακτηρισμός της ένωσης 3	162
Χαρακτηρισμός της ένωσης 4	163
Χαρακτηρισμός της ένωσης 5	165
Χαρακτηρισμός της ένωσης 6	166
Χαρακτηρισμός της ένωσης 29	167
Χαρακτηρισμός της ένωσης 34	168
Χαρακτηρισμός της ένωσης 35	169
Χαρακτηρισμός της ένωσης 36	169
Χαρακτηρισμός της ένωσης 38	170
Χαρακτηρισμός της ένωσης 39	172
Χαρακτηρισμός της ένωσης 40	173
Χαρακτηρισμός της ένωσης 46	174
Χαρακτηρισμός της ένωσης 47	175

Πειράματα σε μεταβολές του ιζώδους.....	176
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	177

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

Συντμήσεις	Ονομασία στην ελληνική
$^1\text{O}_2$	Οξυγόνο απλής κατάστασης
ACN/MeCN	MeCN
CH_2Cl_2	Διχλωρομεθάνιο
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
Boc	Τριτοταγής βουτυλοξυκαρβονυλομάδα
GSH	Γλουταθειόνη
Cys	Κυστεΐνη
DCC	N,N-δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο
DET	Μεταφορά ενέργειας Dexter
DMAP	N,N Διμεθυλαμινοπυριδίνη
DMF	N,N διμεθυλοφορμαμίδιο
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
ECM	Εξωκυττάρια μήτρα
EtOAC	Οξικός αιθυλεστέρας
Hex	Εξάνιο
EtOH	Αιθανόλη
FRET	Μεταφορά ενέργειας συντονισμού Förster
GSH	Γλουταθειόνη
H_2O	Νερό
H_2O_2	Υπεροξείδιο του υδρογόνου
HCl	Υδροχλωρικό οξύ
ICT	Ενδομοριακή Μεταφορά φορτίου
K_2CO_3	Ανθρακικό κάλιο
MeOH	Μεθανόλη
MRI	Απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού
MS	Φασματομετρία μάζης
Na_2SO_4	Θειικό νάτριο
NaN_3	Νατραζίδιο
NHS	N-υδροξυσουκινιμίδιο
NMR	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Ανιόν υπεροξειδίου
PET	Τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων
PET	Φωτοεπαγόμενη μεταφορά ηλεκτρονίων
ROS	Δραστικές ρίζες οξυγόνου
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
rt	Θερμοκρασία δωματίου
SPECT	Υπολογιστική τομογραφία εκπομπής μεμονωμένων φωτονίων
TFA	Τριφθοροξικό οξύ
THF	Τετραϋδροφουράνιο
TICT	Περιστρεφόμενη ενδομοριακή μεταφορά φορτίου
UV-Vis	Ορατό-Υπεριώδες
FL	Φθορισμός

DPBF	2,5-διφαινυλ-3,4-ισοβενζοφουράνιο
BW (bandwidths)	εύρη ζώνης (τα κενά των παραθύρων διέγερσης και εκπομπής του φασματοφωτόμετρου φωταύγειας)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πλέον επιτακτική ανάγκη ανάπτυξης νέων προσεγγίσεων για τη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου οδήγησε στην εξέλιξη θεραπογνωστικών ενώσεων, οι οποίες συνήθως περιλαμβάνουν, εκτός από το αντικαρκινικό φάρμακο, έναν παράγοντα απεικόνισης που βασίζεται κυρίως σε φθορίζοντες παράγοντες. Τα τελευταία χρόνια, μια μη επεμβατική μέθοδος συνδυάζει την απεικόνιση φθορισμού και την φωτοδυναμική θεραπεία σε ένα χρωμοφόρο μόριο. Εκμεταλλευόμενοι, λοιπόν, τις γνώσεις που αφορούν τις διαφορές των καρκινικών κυττάρων έναντι των φυσιολογικών αναπτύξαμε μόρια που να στοχεύουν ειδικά το μικροπεριβάλλον του όγκου. Η υπερέκφραση ορισμένων ενζύμων (π.χ. οξειδάση θειώδους, β-γαλακτοσιδάση κ.α.) και υποδοχέων (π.χ. υποδοχείς γλυκόζης, βιοτίνης κ.α.) καθώς επίσης και διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητές (π.χ. pH, ιώδες, πολικότητα κ.α.), χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη ενός διαγνωστικού και τεσσάρων θεραπογνωστικών ενώσεων που εκπέμπουν στην περιοχή του εγγύς υπέρυθρου, στοχεύουν εκλεκτικά τα καρκινικά ή γηρασμένα κύτταρα, που υποστηρίζουν την ανάπτυξη των καρκινικών και ανταποκρίνονται σε ειδικά ερεθίσματα.

Πιο συγκεκριμένα, συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν δύο χρωμοφόροι σκελετοί που εκπέμπουν στην περιοχή του εγγύς υπέρυθρου, ο πρώτος μιας ημικυανίνης και ο δεύτερος τύπου άλατος φλαβυλίου. Ο τελευταίος είναι ενεργός στο πλαίσιο της φωτοδυναμικής θεραπείας και μπορεί να χαρακτηριστεί ως φωτοευαισθητοποιητής. Στην συνέχεια οι παράγοντες αυτοί απεικόνισης συνδυάστηκαν μέσω σταθερών δεσμών με διάφορα μικρά μόρια (π.χ. τροποποιημένα ανάλογα D-βιοτίνης, τριφαινυλοφωσφίνης και μορφολίνης) ώστε να τις κατευθύνουν στα κύτταρα στόχους. Στη συνέχεια προσαρτήθηκαν διάφοροι μοριακοί ιχνηθέτες με αποτέλεσμα την απόσβεση του φθορισμού τους. Αλληλεπίδραση αυτών με μόρια που υπερεκφράζονται στα κύτταρα στόχους (αυξημένα επίπεδα βιοθειολών, β-γαλακτοσιδάσης) οδηγούν σε μεταβολή των φωτοφυσικών ιδιοτήτων των μορίων. Επίσης, τα μόρια διαθέτουν δομές που περιστρέφονται σε χαμηλές τιμές ιώδους, ενώ μειώνουν την περιστροφή τους όταν οι τιμές του ιώδους αυξάνονται. Αυτό έχει ως συνέπεια την μεταβολή της έντασης απορρόφησης και εκπομπής των χρωστικών αυτών. Ο καθαρισμός των ενδιάμεσων και τελικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με κατάλληλες τεχνικές όπως η χρωματογραφία στήλης και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High-performance liquid chromatography, HPLC) και ταυτοποιήθηκαν με 1D/2D φασματοσκοπία NMR και φασματομετρία μάζας. Η αξιολόγηση των ενώσεων έλαβε χώρα μέσω φασματοσκοπίας UV-Vis και φθορισμού, όπου ελέγχθηκε η απόκριση, η ταχύτητα απόκρισης και η εκλεκτικότητα των ενώσεων παρουσία κατάλληλου αναλύτη.

ABSTRACT

The unmet need to develop novel approaches for cancer diagnosis and treatment has led to the evolution of theranostic agents, which usually include an anticancer drug and a fluorophore. In recent years, a non-invasive method has been developed which includes bioimaging and photodynamic therapy in a single chromophore. Taking advantage of the knowledge regarding the differences between cancer cells and normal cells, we have developed molecules that specifically target the tumor microenvironment. Overexpression of certain enzymes (e.g., sulfite oxidase, β-galactosidase) and receptors (e.g., glucose and biotin receptors) has been used as molecular targets. Certain physicochemical properties like pH, viscosity, and polarity have also been explored as diagnostic tools in determining the tumor microenvironment. Herein, we report one diagnostic and

four therapeutic compounds that emit in the near-infrared region and selectively target cancer or senescent cells.

More specifically, two fluorophores emitting in the near-infrared region, one of hemicyanine and other of flavylum salt type, were synthesized and characterized. The latter is active in photodynamic therapy and can be characterized as a photosensitizer. These imaging agents were then combined via stable linkers with various small molecules (e.g., modified D-biotin, triphenylphosphine, and morpholine analogs) to direct them to target cells. Various molecular tracers were then attached resulting in quenching of their fluorescence. Interaction of these with molecules that are overexpressed in the target cells (increased levels of biothiols, β -galactosidase) lead to a change in the photophysical properties of the molecules. Additionally, the molecules have domains that rotate at low viscosity values while reducing their rotation when the viscosity values increase. This has the consequence of changing the intensity of absorption and emission of these agents. Purification of the intermediate and final compounds was performed by appropriate techniques such as column chromatography and high-performance liquid chromatography (HPLC) and characterized by 1D/2D NMR spectroscopy and high resolution mass spectrometry. The photophysical properties were recorded using UV-Vis and fluorescence spectroscopy where the response, response speed and selectivity of the compounds in the presence of an appropriate analyte were performed

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καρκίνος

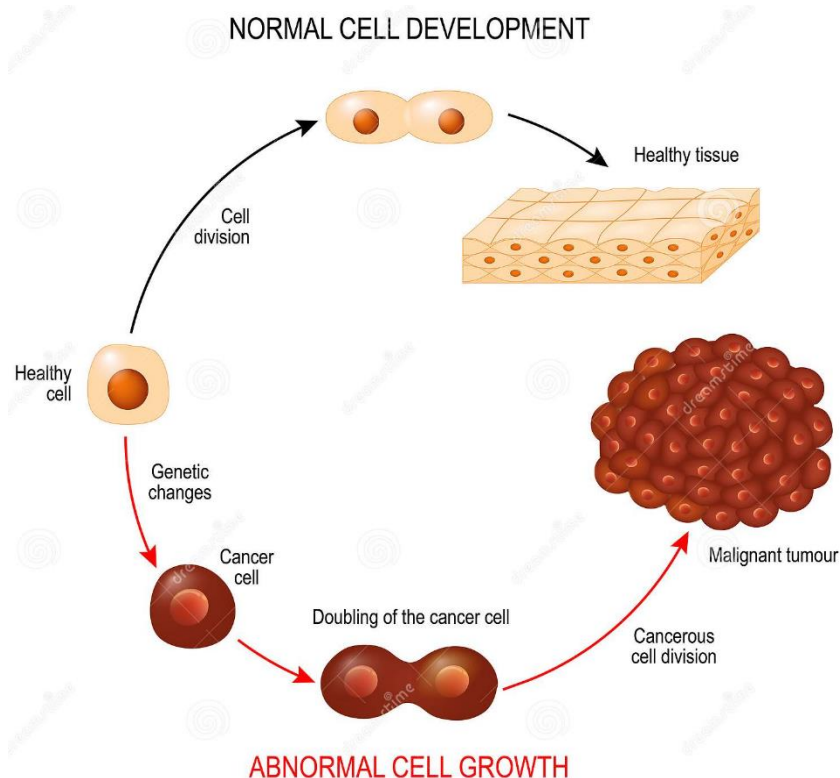
Ο όρος «καρκίνος» περιλαμβάνει ένα σύνολο ασθενειών που μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά. Διαθέτει θα λέγαμε αποθαρρυντικό εύρος στην ποικιλομορφία, στην γενετική έκταση, τη βιολογία των κυττάρων και των ιστών, την παθολογία και την ανταπόκριση στη θεραπεία [2]. Είναι μια ασθένεια γνωστή σε όλους μας, καθώς κατέχει μία από τις πρώτες θέσεις αναφορικά με τις αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Κατατάσσεται στην κατηγορία των μη μεταδοτικών νοσημάτων (MMN, Noncommunicable diseases, NCDs), για τις οποίες ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ, World Health Organization, WHO), παραθέτει ότι αφορούν το 71% των θανάτων παγκοσμίως. Οι καρδιαγγειακές παθήσεις εκτιμάται ότι ευθύνονται για τους περισσότερους θανάτους από NCDs (αντιπροσωπευτικά: 17,9 εκατομμύρια ανθρώπους ετησίως), ακολουθούμενοι από καρκίνους (9,3 εκατομμύρια), αναπνευστικές παθήσεις (4,1 εκατομμύρια) και διαβήτη (1,5 εκατομμύρια). Επιμέρους στατιστικά στοιχεία σχετικά με το πόσο συχνά παρουσιάζονται περιστατικά διαφόρων ειδών καρκίνων και το ποσοστό θνησιμότητας αυτών παρατίθενται στον **Πίνακα 1** [3]. Πρόσφατες στατιστικές μελέτες θέτουν την πανδημία COVID-19 (Coronavirus disease) που οφείλεται στον ιό, επονομαζόμενο ως SARS-CoV-2, στις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Μάλιστα, έως τις 20 Απριλίου 2022, περισσότερα από 504,4 εκατομμύρια επιβεβαιωμένα κρούσματα COVID-19 και πάνω από 6,2 εκατομμύρια σχετικοί θάνατοι είχαν αναφερθεί στον ΠΟΥ. Παράλληλα τα άτομα με ήδη υπάρχοντα μη μεταδιδόμενα νοσήματα όπως ο καρκίνος, διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο σοβαρής ασθένειας και θανάτου λόγω του COVID-19. Συνδυασμός, λοιπόν, των παθήσεων μπορεί να αποβεί μοιραίος για ένα μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού [4]. Σε αντίθεση όμως με την COVID-19, ο καρκίνος μελετάται από την επιστημονική κοινότητα για πολλά χρόνια και ακόμη δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, ενώ οι υπάρχουσες τεχνικές διάγνωσης και θεραπείας του χρήζουν βελτίωσης. Οι στατιστικές αυτές μελέτες που παρουσιάζονται αντικατοπτρίζουν αυτήν ακριβώς την αδήριτη ανάγκη κατανόησης, διάγνωσης και αντιμετώπισης των διαφόρων μορφών καρκίνων.

Πίνακας 1: ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ: Το 2022, υπολογίζεται ότι θα υπάρξουν 1.918.030 νέα κρούσματα καρκίνου σε οποιαδήποτε περιοχή και υπολογίζεται ότι 609.360 άνθρωποι θα πεθάνουν από αυτή την ασθένεια [3].

A/A	Σύνηθες Μορφές-Είδη Καρκίνου	Εκτιμώμενες νέες περιπτώσεις 2022	Εκτιμώμενοι θάνατοι 2022
1.	Καρκίνος του μαστού (Γυναίκες)	287,850	43,250
2.	Καρκίνος του προστάτη	268,490	34,500
3.	Καρκίνος του πνεύμονα και βρόγχου	236,740	130,180
4.	Καρκίνος του παχέος εντέρου	151,030	52,580
5.	Μελάνωμα του δέρματος	99,780	7,650
6.	Καρκίνος της ουροδόχου κύστης	81,180	17,100
7.	Non-Hodgkin Λέμφωμα	80,470	20,250
8.	Καρκίνος του νεφρού και νεφρικής πυέλου	79,000	13,920
9.	Καρκίνος της μήτρας	65,950	12,550
10.	Καρκίνος στο πάγκρεας	62,210	49,830
	Καρκίνος σε οποιοδήποτε μέρος	1,918,030	609,360

1.2 Χαρακτηριστικά ενεργοποίησης των καρκινικών κυττάρων

Τα φυσιολογικά κύτταρα αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται, μέσω μιας διαδικασίας γνωστής ως κυτταρική διαίρεση, για να καλύψουν τις ανάγκες του οργανισμού (**Εικόνα 1**). Όταν τα ήδη υπάρχοντα κύτταρα γερνούν ή καταστρέφονται, θανατώνονται, και έτσι νέα κύτταρα παίρνουν τη θέση τους. Μερικές φορές αυτή η διαδικασία καταρρέει και τα μη φυσιολογικά ή κατεστραμμένα κύτταρα αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται όταν δεν θα έπρεπε, οδηγώντας στην ασθένεια που καλούμε «καρκίνο». Μπορεί να ξεκινήσει σε οποιοδήποτε σημείο και αργότερα να εξαπλωθεί σε άλλα μέρη του σώματος [5].

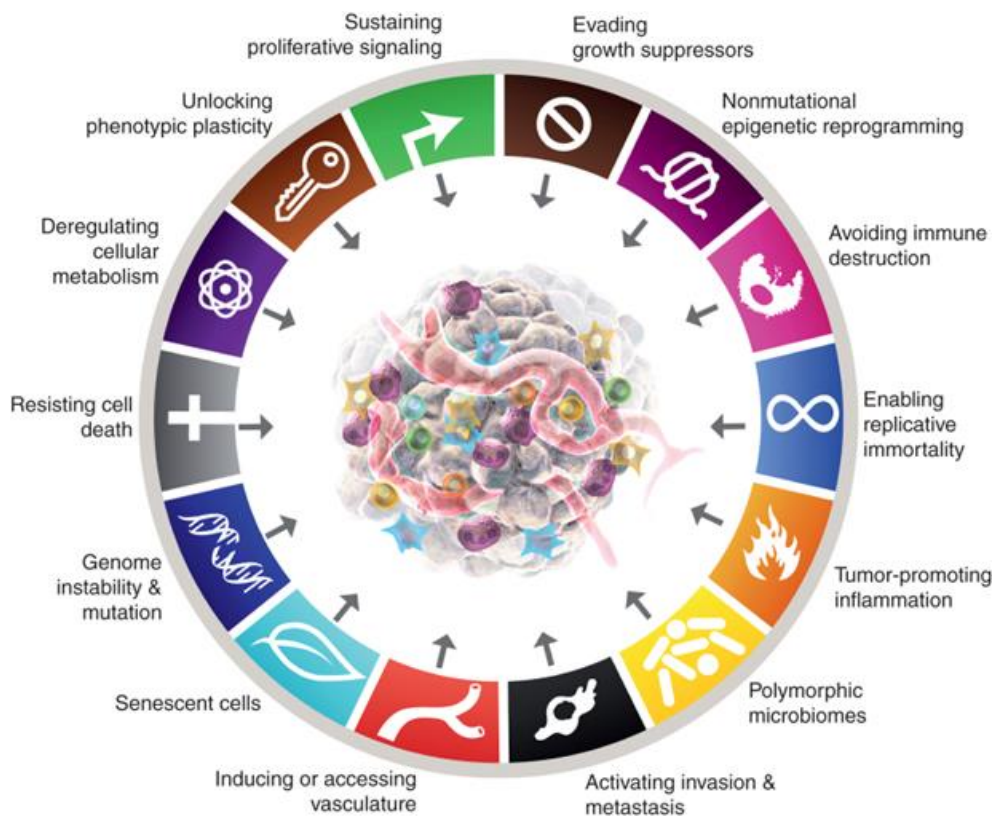


Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων και ανάπτυξης όγκου [6]

Ο καρκίνος, δυστυχώς, είναι μια ασθένεια με τεράστια πολυπλοκότητα και δυσκολία στην κατανόησή του. Περισσότεροι από 100 διαφορετικοί τύποι καρκίνου και υπότυποι όγκων μπορούν να βρεθούν σε συγκεκριμένα όργανα. Το γεγονός αυτό προκαλεί προβλήματα στην αντιμετώπιση του. Η ανάγκη, λοιπόν, για τον εξορθολογισμό της νόσου και την νοητική απλούστευσή της είναι υψηλής σημασίας. Η πίστη σε μια τέτοια απλοποίηση πηγάζει άμεσα από τις διδασκαλίες της κυτταρικής βιολογίας, ότι σχεδόν όλα τα κύτταρα θηλαστικών φέρουν έναν παρόμοιο μοριακό μηχανισμό που ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και τον θάνατό τους. Έτσι, στην προσπάθεια κατανόησής του προέκυψε μια εννοιολογική οργανωτική αρχή που περιγράφει εκείνα τα χαρακτηριστικά των κυττάρων που οδηγούν σε παρεκκλίνουσες γονοτυπικές και φαινοτυπικές ικανότητες και κατά συνέπεια στην ανάπτυξη όγκων [7].

Τα «χαρακτηριστικά ενεργοποίησης» των καρκινικών κυττάρων είναι τα εξής:

1. Η διατήρηση της πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης.
2. Η αποφυγή της καταστολής της ανάπτυξης.
3. Η αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο.
4. Η ενεργοποίηση της αναπαραγωγικής αθανασίας.
5. Η πρόκληση αγγειογένεσης.
6. Η ανάπτυξη γενωμικής αστάθειας, η οποία οδηγεί σε δημιουργία τυχαίων μεταλλάξεων
7. Η ενεργοποίηση της μετάστασης.
8. Ο επαναπρογραμματισμός του ενεργειακού μεταβολισμού.
9. Η αποφυγή της καταστροφής από το ανοσοποιητικό σύστημα.
10. Η ενεργοποίηση της φαινοτυπικής πλαστικότητας.
11. Ο επιγενετικός επαναπρογραμματισμός που δεν οφείλεται σε μεταλλάξεις.
12. Τα πολυμορφικά μικροβιώματα.
13. Τα γηρασμένα κύτταρα[2] (**Εικόνα 2**).



Εικόνα 2: Χαρακτηριστικά ενεργοποίησης των καρκινικών κυττάρων. Προτείνεται ότι οι περισσότεροι αν όχι όλοι οι καρκίνοι έχουν αποκτήσει το ίδιο σύνολο λειτουργικών ικανοτήτων κατά την ανάπτυξή τους μέσω διαφόρων μηχανιστικών στρατηγικών [2].

1.2.1 Η διατήρηση της πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης

Θεμελιώδες χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων αποτελεί η ικανότητά τους να διατηρούν χρόνιο πολλαπλασιασμό. Οι φυσιολογικοί ιστοί ελέγχουν την παραγωγή και απελευθέρωση σημάτων ενεργοποίησης της ανάπτυξης, διασφαλίζοντας έτσι μια ομοιόσταση του αριθμού των κυττάρων και συνεπώς τη διατήρηση της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής και λειτουργίας των ιστών. Τα καρκινικά κύτταρα απορρυθμίζουν αυτά τα σήματα, και θα λέγαμε ότι γίνονται κύριοι των δικών τους πεπρωμένων. Τα σήματα ενεργοποίησης μεταφέρονται σε μεγάλο βαθμό από αυξητικούς παράγοντες που δεσμεύουν υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων, οδηγώντας στην εκπομπή σημάτων μέσω διακλαδισμένων ενδοκυτταρικών οδών σηματοδότησης. Συχνά αυτά τα σήματα επηρεάζουν και άλλες κυτταρικές-βιολογικές ιδιότητες, όπως η επιβίωση των κυττάρων και ο ενεργειακός μεταβολισμός. Μπορούν επίσης να αποκτήσουν την ικανότητα να διατηρούν πολλαπλασιαστική σηματοδότηση με διάφορους εναλλακτικούς τρόπους. Για παράδειγμα, έχουν την ικανότητα να παράγουν προσδότες αυξητικού παράγοντα, στους οποίους μπορούν να ανταποκριθούν μέσω της έκφρασης συγγενών υποδοχέων, με αποτέλεσμα την αυτοκρινή πολλαπλασιαστική διέγερση. Εναλλακτικά, τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να στέλνουν σήματα για διέγερση φυσιολογικών κυττάρων εντός του υποστηρικτικού περιβάλλοντος του όγκου, παρέχοντας στα ίδια κύτταρα διάφορους αυξητικούς παράγοντες. Η σηματοδότηση των υποδοχέων μπορεί επίσης να απορρυθμιστεί, αυξάνοντας τα επίπεδα των πρωτεϊνών υποδοχέα που εμφανίζονται στην μεμβράνη του καρκινικού κυττάρου. Οι αυξητικοί παράγοντες μπορούν επίσης να ενεργοποιούνται ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση υποδοχέα με τη διαμεσολάβηση προσδέτη. Αυτό συμβαίνει με την ανεξάρτητη από υποδοχέα ενεργοποίηση συστατικών οδών σηματοδότησης που λειτουργούν καθοδικά της σηματοδοτικής πορείας αυτών των υποδοχέων [7].

1.2.2 Η αποφυγή της αναστολής της ανάπτυξης

Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν επίσης να παρακάμπτουν ισχυρούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν αρνητικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Πολλοί από αυτούς τους μηχανισμούς εξαρτώνται από τις δράσεις των γονιδίων καταστολής όγκων. Μέχρι σήμερα έχουν μελετηθεί δεκάδες ογκοκατασταλτικά που λειτουργούν με διάφορους τρόπους για να περιορίσουν την κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό. Δύο πολύ σημαντικοί εκπρόσωποι αυτών των γονιδίων είναι εκείνα που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες RB και TP53. Λειτουργούν ως κεντρικοί κόμβοι ελέγχου μέσα σε δύο βασικά συμπληρωματικά κυτταρικά ρυθμιστικά κυκλώματα που διέπουν τις αποφάσεις των κυττάρων να πολλαπλασιαστούν ή, εναλλακτικά, να ενεργοποιήσουν προγράμματα γήρανσης και απόπτωσης. Αναφορικά με το γονίδιο *Rb*, όταν το κύτταρο είναι έτοιμο να διαιρεθεί, το *Rb* φωσφορυλιώνεται σε *pRb*, οδηγώντας στην απενεργοποίηση της δραστηριότητας της πρωτεΐνης. Το άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το γονίδιο *TP53* που παρέχει τις οδηγίες για την παραγωγή μιας πρωτεΐνης όγκου την p53, η οποία με τη σειρά της δρα ως ογκοκατασταλτικό [7].

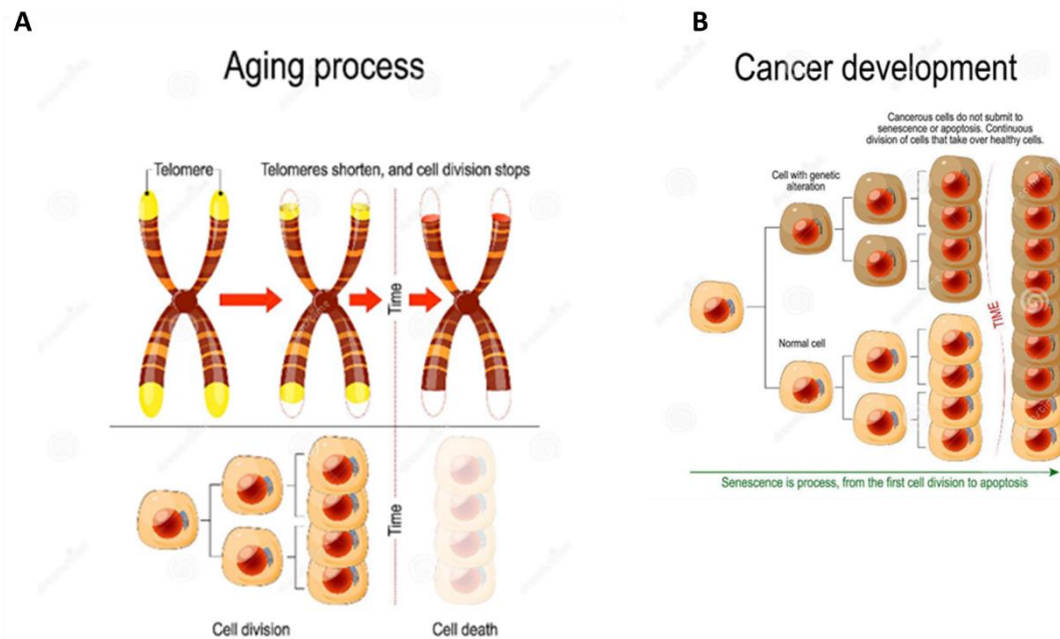
1.2.3 Η αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (Programmed Cell Death, PCD), που αναφέρεται στην απόπτωση, στην αυτοφαγία και στην προγραμματισμένη νέκρωση, προτείνεται να είναι ο θάνατος ενός κυττάρου σε οποιαδήποτε παθολογική μορφή, όταν διαμεσολαβείται από έναν ενδοκυτταρικό μηχανισμό. Η απόπτωση είναι μια διεργασία προγραμματισμένου, αυτοεπισχυόμενου και μη αντιστρεπτού κυτταρικού θανάτου, και είναι εκείνη που σχετίζεται περισσότερο με την ογκογένεση. Η διαδικασία της απόπτωσης χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένες μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές των κυττάρων που πεθαίνουν, συμπεριλαμβανομένης της συρρίκνωσης των κυττάρων, της πυρηνικής συμπύκνωσης και του κατακερματισμού, της δυναμικής εκροής της μεμβράνης και της απώλειας πρόσφυσης σε γειτονικά κύτταρα ή στην εξωκυτταρική μήτρα. Οι βιοχημικές αλλαγές περιλαμβάνουν τη διάσπαση του χρωμοσωμικού DNA σε ενδοπυρηνικά θραύσματα, την εξωτερικήυση φωσφατιδυλοσερίνης και έναν αριθμό ενδοκυτταρικών σχάσεων του υποστρώματος με ειδική πρωτεόλυση. Πιο συγκεκριμένα, η «αποπτωτική σκανδάλη» που μεταδίδει σήματα μεταξύ των ρυθμιστών και των τελεστών ελέγχεται από την εξισορρόπηση των προ- και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών (αναστολείς απόπτωσης όπως Bcl-2 και προαποπτωτικές πρωτεΐνες ενεργοποίησης Bax και Bak). Μετά από μια σηματοδότηση κυτταρικού θανάτου, οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες είναι σε θέση να υποστούν μέτα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που οδηγούν στην ενεργοποίησή τους και την μετατόπισή τους στα μιτοχόνδρια, από τα οποία μπορεί να ξεκινήσει η απόπτωση. Όταν απαλλάσσονται από τους αντιαποπτωτικούς συγγενείς τους, οι πρωτεΐνες ενεργοποίησης διαταράσσουν την ακεραιότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, προκαλώντας την απελευθέρωση προαποπτωτικών πρωτεϊνών σηματοδότησης, η πιο σημαντική από τις οποίες είναι το κυτόχρωμα c. Το απελευθερωμένο κυτόχρωμα c ενεργοποιεί, με τη σειρά του, μια σειρά κασπασών που ενεργούν μέσω των πρωτεολυτικών τους δραστηριοτήτων, για να προκαλέσουν τις πολλαπλές κυτταρικές αλλαγές που σχετίζονται με τον αποπτωτικό προγραμματισμό. Τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν διάφορους μηχανισμούς περιορισμού της απόπτωσης. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η απώλεια της λειτουργίας του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53, το οποίο λειτουργεί ως αισθητήρας βλάβης του DNA. Παράλληλα, μπορούν να υπερεκφράζουν αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες (Bcl-2, Bcl-xL) ή να υποεκφράζουν προαποπτωτικές πρωτεΐνες (Bax, Puma) [7], [8].

1.2.4 Η ενεργοποίηση της αναπαραγωγικής αθανασίας

Τα φυσιολογικά κύτταρα έχουν περιορισμένο αριθμό διαδοχικών κύκλων ανάπτυξης και διαίρεσης. Αυτό ρυθμίζεται κυρίως μέσω δύο μηχανισμών: (1) τη γήρανση, μια τυπικά μη αναστρέψιμη είσοδο σε μια μη πολλαπλασιαστική αλλά βιώσιμη κατάσταση και (2) μια κρίση, η οποία περιλαμβάνει τον κυτταρικό θάνατο. Κατά συνέπεια τα κύτταρα οδηγούνται πρώτα σε επαγωγή γήρανσης, η οποία εμφανίζεται εννοιολογικά ως προστατευτικό φράγμα στη νεοπλαστική

επέκταση που μπορεί να προκληθεί από διάφορες ανωμαλίες που σχετίζονται με πολλαπλασιασμό. Τέτοιες ανωμαλίες περιλαμβάνουν το υψηλό επίπεδο ογκογονικής σηματοδότησης και την συντόμευση των τελομερών (δηλαδή των πολλαπλών διαδοχικών εξανουκλεοτιδικών επαναλήψεων που προστατεύουν τα άκρα των γονιδίων από την συντόμευση τους κατά την αντιγραφή, **Εικόνα 3Α**). Στη συνέχεια, εκείνα τα κύτταρα που καταφέρνουν να παρακάμψουν αυτό το φράγμα, εισέρχονται σε μια φάση κρίσης, στην οποία η μεγάλη πλειονότητα των κυττάρων στον πληθυσμό θανατώνεται. Σε σπάνιες περιπτώσεις, τα κύτταρα αναδύονται από έναν πληθυσμό σε κρίση και εμφανίζουν απεριόριστες δυνατότητες αναπαραγωγής (**Εικόνα 3Β**). Αυτή η μετάβαση έχει ονομαστεί αθανασία, ένα χαρακτηριστικό που οι περισσότερες καθιερωμένες κυτταρικές σειρές κατέχουν λόγω της ικανότητάς τους να πολλαπλασιάζονται στον πληθυσμό χωρίς ενδείξεις γήρανσης ούτε κρίσης. Αυτό επιτυγχάνεται με την υπερέκφραση ενζύμων όπως π.χ. με την έκφραση της τελομεράσης, δηλαδή της εξειδικευμένης πολυμεράσης DNA που προσθέτει τμήματα επαναλήψεων τελομερών στα άκρα του DNA [7].



Εικόνα 3: Α: Τελομερή. Διαδικασία γήρανσης [9]. Β: Ανάπτυξη καρκίνου προσπερνώντας την διαδικασία γήρανσης [10].

1.2.5 Η πρόκληση αγγειογένεσης

Όπως οι φυσιολογικοί ιστοί, έτσι και οι όγκοι χρειάζονται θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο, καθώς και τη δυνατότητα απομάκρυνσης μεταβολικών αποβλήτων και διοξειδίου του άνθρακα. Η σχετική με τον όγκο νεοαγγείωση, που δημιουργείται από τη διαδικασία της αγγειογένεσης, δηλαδή τη γέννηση νέων ενδοθηλιακών κυττάρων και την οργάνωσή τους σε αγγεία, καλύπτει αυτές τις ανάγκες. Στον ενήλικα, ως μέρος φυσιολογικών διεργασιών όπως η επούλωση τραυμάτων, η αγγειογένεση ενεργοποιείται, αλλά μόνο παροδικά. Αντίθετα, κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου, ένας «αγγειογενετικός διακόπτης» ενεργοποιείται σχεδόν πάντα και παραμένει ανοιχτός, προκαλώντας ένα αγγειακό σύστημα να δημιουργεί συνεχώς νέα αγγεία που βοηθούν στη διατήρηση των επεκτεινόμενων νεοπλαστικών αναπτύξεων.

Τα πιο γνωστά πρωτότυπα επαγωγών και αναστολέων αγγειογένεσης είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας-A (Vascular endothelial growth factor A, VEGF-A) και η θρομβοσπονδίνη-1 (Thrombospondin 1, TSP-1). Το γονίδιο VEGF-A κωδικοποιεί προσδέτες που εμπλέκονται στην ενορχήστρωση της ανάπτυξης νέων αιμοφόρων αγγείων κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής και της μεταγεννητικής ανάπτυξης, και στη συνέχεια στην ομοιοστατική επιβίωση ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις στον ενήλικα. Η TSP-1, είναι ένα βασικό ισοζύγιο στον αγγειογόνο διακόπτη, και δεσμεύει επίσης τους

διαμεμβρανικούς υποδοχείς που εμφανίζονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα προκαλώντας κατασταλτικά σήματα που μπορούν να εξουδετερώσουν τα προαγγειογενετικά ερεθίσματα.

Τα αιμοφόρα αγγεία που παράγονται εντός όγκων με χρόνια ενεργοποιημένη αγγειογένεση και με ένα μη ισορροπημένο μίγμα προαγγειογόνων σημάτων είναι τυπικά παρεκκλίνοντα: ο νεοαγγειακός όγκος χαρακτηρίζεται από πρόωρη τριχοειδή βλάστηση, συρραφή και υπερβολική διακλάδωση αγγείων, παραμορφωμένα και διευρυμένα αγγεία, ακανόνιστη ροή αίματος, μικροαιμορραγία, διαρροή και μη φυσιολογικά επίπεδα πολλαπλασιασμού και απόπτωσης ενδοθηλιακών κυττάρων. Ιστορικά, η αγγειογένεση θεωρήθηκε σημαντική μόνο όταν είχαν σχηματιστεί ταχέως αναπτυσσόμενοι μακροσκοπικοί όγκοι, αλλά πιο πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα δείχνουν ότι η αγγειογένεση συμβάλλει επίσης στη μικροσκοπική προ-κακοήγη φάση της νεοπλασματικής εξέλιξης, ενισχύοντας περαιτέρω την κατάστασή της ως αναπόσπαστο χαρακτηριστικό του καρκίνου [7].

1.2.6 Ανάπτυξη γενωμικής αστάθειας, η οποία οδηγεί σε δημιουργία τυχαίων μεταλλάξεων

Η γενετική αστάθεια αποτελεί κλειδί στην εκδήλωση του καρκίνου, αφού η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων συμβάλλουν στον σχηματισμό όγκου. Ωστόσο, προκειμένου να συμβεί αυτό έχει προηγηθεί μια σειρά από γεγονότα που επηρεάζουν την διαδικασία της απόπτωσης και γενικότερα του μετασχηματισμού των υγιών κυττάρων σε καρκινικά. Πολλές μορφές καρκίνου σχετίζονται με τη γενετική αστάθεια, η οποία αυξάνει τις πιθανότητες μεταλλαξιγένεσης [7].

1.2.7 Η ενεργοποίηση της εισβολής και της μετάστασης

Ακόμα και σε ιστούς που φαίνονται φαινομενικά στατικοί, τα κύτταρα αντιμετωπίζουν συνεχώς μια ποικιλία μηχανικών δυνάμεων και, με τη σειρά τους, ασκούν ενεργά μηχανική δύναμη στο περιβάλλον τους. Αυτές οι δυνάμεις μπορούν να προέρχονται από γειτονικά κύτταρα ή την εξωκυτταρική μήτρα (Extracellular matrix, ECM). Ακολουθείται μια διαδικασία πολλαπλών βημάτων εισβολής και μετάστασης. Αυτή η απεικόνιση προβλέπει μια διαδοχή κυτταρικών/βιολογικών αλλαγών, ξεκινώντας με τοπική, και στη συνέχεια ενδοφλέβια εισβολή από καρκινικά κύτταρα σε κοντινά αιματικά και λεμφικά αγγεία. Ακολουθεί διέλευση καρκινικών κυττάρων μέσω των λεμφικών και αιματογόνων συστημάτων, και διαφυγή καρκινικών κυττάρων από τον αυλό τέτοιων αγγείων στο παρέγχυμα απομακρυσμένων ιστών (εξαγγείωση). Στη συνέχεια, σχηματίζονται μικρά οζίδια καρκινικών κυττάρων (μικρομεταστάσεις), και τέλος αναπτύσσονται μικρομεταστατικές βλάβες σε μακροσκοπικούς όγκους, με το τελευταίο αυτό βήμα να ονομάζεται «αποικισμός»

Η μετάσταση μπορεί να χωριστεί σε δύο κύριες φάσεις: τη φυσική διάδοση των καρκινικών κυττάρων από τον πρωτογενή όγκο σε απομακρυσμένους ιστούς και την προσαρμογή αυτών των κυττάρων σε ξένα μικροπεριβάλλοντα ιστού που οδηγεί σε επιτυχή αποικισμό, δηλαδή την ανάπτυξη μικρομεταστάσεων σε μακροσκοπικούς όγκους. Τα περισσότερα διαδεδομένα καρκινικά κύτταρα είναι πιθανό να είναι ελάχιστα προσαρμοσμένα, τουλάχιστον αρχικά, στο μικροπεριβάλλον του ιστού στον οποίο έχουν βρεθεί. Κατά συνέπεια, κάθε τύπος διαδεδομένου καρκινικού κυττάρου μπορεί να χρειαστεί να αναπτύξει το δικό του κατά περίπτωση σύνολο λύσεων στο πρόβλημα της ευημερίας στο νέο μικροπεριβάλλον. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η συρρίκνωση των καρκινικών κυττάρων και η υιοθέτηση μιας κατάστασης αναστρέψιμης αδράνειας. Τέτοια κύτταρα μπορεί να εξέλθουν από αυτήν την κατάσταση και να συνεχίσουν την ενεργό ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό όταν το επιτρέπουν αλλαγές στο μικροπεριβάλλον των ιστών, όπως η πρόσβαση σε περισσότερα θρεπτικά συστατικά. Ορισμένα μικρο-περιβάλλοντα ιστών μπορεί να έχουν προδιάθεση ώστε να είναι εγγενώς φιλόξενα σε μεταστατικά καρκινικά κύτταρα. Έχοντας αναπτύξει μια τέτοια ικανότητα αποικισμού ειδικά για τους ιστούς, τα κύτταρα σε μεταστατικές αποικίες μπορεί να προχωρήσουν στη περαιτέρω μετάσταση, όχι μόνο σε νέες θέσεις στο σώμα αλλά και πίσω στους πρωτογενείς όγκους από όπου προέκυψαν [7].

1.2.8 Ο επαναπρογραμματισμός του ενεργειακού μεταβολισμού

Ο χρόνιος και συχνά ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός που αντικατοπτρίζει την ουσία της νεοπλασματικής νόσου συνεπάγεται όχι μόνο τον απορρυθμισμένο έλεγχο του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, αλλά και τις αντίστοιχες προσαρμογές του ενεργειακού μεταβολισμού προκειμένου να τροφοδοτήσει την ανάπτυξη και τη διαίρεση των κυττάρων. Υπό αερόβιες συνθήκες, τα φυσιολογικά κύτταρα επεξεργάζονται γλυκόζη, πρώτα σε πυροσταφυλικό μέσω γλυκόλυσης στο κυτοσόλιο και στη συνέχεια σε διοξείδιο του άνθρακα στα μιτοχόνδρια μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Κάτω από αναερόβιες συνθήκες, προτιμάται η αναερόβια γλυκόλυση όπου σχετικά λίγο πυροσταφυλικό στέλνεται στα μιτοχόνδρια που καταναλώνουν οξυγόνο. Ένα ανώμαλο χαρακτηριστικό του μεταβολισμού της ενέργειας των καρκινικών κυττάρων είναι ότι ακόμη και παρουσία οξυγόνου, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να επαναπρογραμματίσουν τον μεταβολισμό της γλυκόζης τους, και συνεπώς την παραγωγή ενέργειας, περιορίζοντας σε μεγάλο βαθμό τον ενεργειακό μεταβολισμό προς την γλυκόλυση έναντι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, οδηγώντας σε μια κατάσταση που έχει ονομαστεί «αερόβια γλυκόλυση». Ένας τέτοιος επαναπρογραμματισμός του ενεργειακού μεταβολισμού είναι φαινομενικά παράδοξος, καθώς τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να αντισταθμίσουν την ~18-πλάσια χαμηλότερη απόδοση της παραγωγής ATP που παρέχεται από τη γλυκόλυση σε σχέση με τη μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση (μεταβολισμός Warburg). Αυτή η εξάρτηση από τη γλυκόλυση μπορεί να ενισχυθεί περαιτέρω υπό τις υποξικές συνθήκες που λειτουργούν σε πολλούς όγκους: το σύστημα απόκρισης υποξίας δρα πλειοτροπικά για να ρυθμίσει τους μεταφορείς γλυκόζης και πολλαπλά ένζυμα της γλυκολυτικής οδού. Έτσι, τόσο οι ογκοπρωτεΐνες (Ras) όσο και η υποξία μπορούν ανεξάρτητα να αυξήσουν τα επίπεδα των μεταγραφικών παραγόντων HIF1a και HIF2a, οι οποίοι με τη σειρά τους ρυθμίζουν την γλυκόλυση. Η αυξημένη γλυκόλυση επιτρέπει την εκτροπή γλυκολυτικών ενδιάμεσων σε διάφορες βιοσυνθετικές οδούς, συμπεριλαμβανομένων αυτών που παράγουν νουκλεοζίτες και αμινοξέα. Αυτό διευκολύνει, με τη σειρά του, τη βιοσύνθεση των μακρομορίων και των οργανιδίων που απαιτούνται για τη συναρμολόγηση νέων κυττάρων.

Είναι ενδιαφέρον ότι ορισμένοι όγκοι έχει βρεθεί ότι περιέχουν δύο υποπληθυσμούς καρκινικών κυττάρων που διαφέρουν στις οδούς παραγωγής ενέργειας. Ένας υποπληθυσμός αποτελείται από κύτταρα που εξαρτώνται από τη γλυκόζη («Warburg-effect») και εκκρίνουν γαλακτικό, ενώ τα κύτταρα του δεύτερου πληθυσμού εισάγουν και χρησιμοποιούν κατά προτίμηση το γαλακτικό που παράγεται από τα γειτονικά τους κύτταρα ως κύρια πηγή ενέργειας τους, χρησιμοποιώντας μέρος του κύκλου κιτρικού οξέος. Αυτοί οι δύο πληθυσμοί προφανώς λειτουργούν συμβιωτικά: τα υποξικά καρκινικά κύτταρα εξαρτώνται από τη γλυκόζη ως καύσιμο και εκκρίνουν το γαλακτικό ως απόβλητο, το οποίο εισάγεται και χρησιμοποιείται κατά προτίμηση ως καύσιμο από τα καλύτερα οξυγονωμένα κύτταρα. Αν και αυτός ο προκλητικός τρόπος συμβίωσης εντός του όγκου, δεν έχει ακόμη γενικευτεί, η συνεργασία μεταξύ των κυττάρων που εκκρίνουν γαλακτικό και αυτών που τροφοδοτούνται από αυτό για την ανάπτυξη του όγκου φαίνεται να αντικατοπτρίζει και πάλι την επιλογή ενός φυσιολογικού μηχανισμού. Επιπλέον, γίνεται εμφανές ότι η οξυγόνωση, που κυμαίνεται από τη νορμοξία έως την υποξία, δεν είναι απαραίτητα στατική στους όγκους, αλλά αντίθετα κυμαίνεται χρονικά και περιφερειακά, πιθανώς ως αποτέλεσμα της αστάθειας και της χαοτικής οργάνωσης της όγκο-σχετιζόμενης νεοαγγείωσης [7].

1.2.9 Η αποφυγή της καταστροφής από το ανοσοποιητικό σύστημα

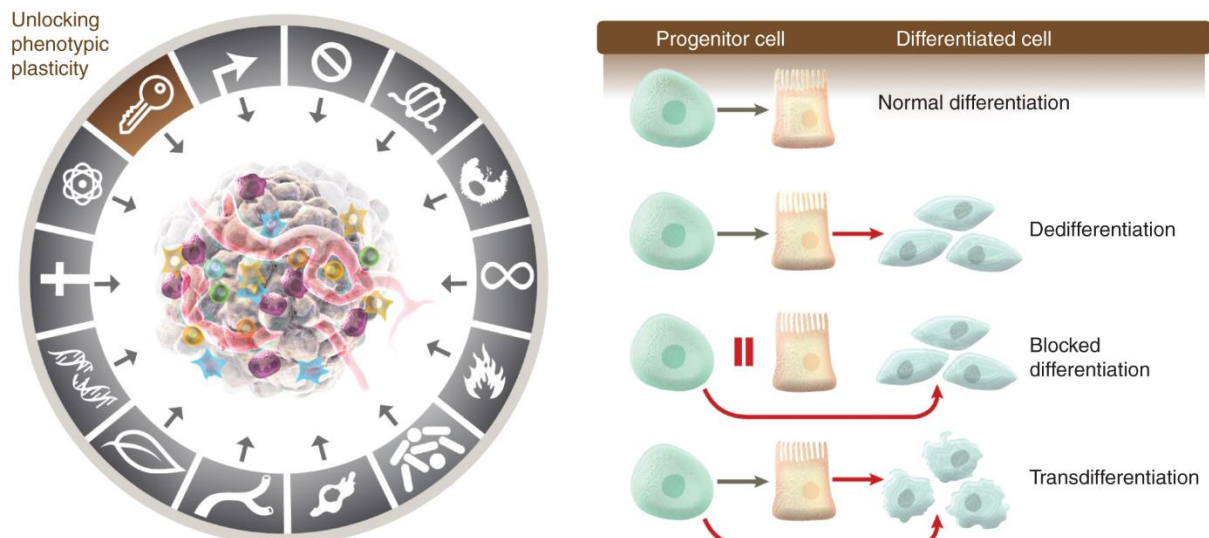
Ένα ακόμη ανεπίλυτο ζήτημα γύρω από τον σχηματισμό όγκων περιλαμβάνει το ρόλο που παίζει το ανοσοποιητικό σύστημα στην αντίσταση ή την εξάλειψη του σχηματισμού και της εξέλιξης των αρχικών νεοπλασιών, των όγκων όψιμου σταδίου και των μικρομεταστάσεων. Η μακροχρόνια θεωρία της απόκρισης του ανοσοποιητικού συστήματος προτείνει ότι τα κύτταρα και οι ιστοί παρακολουθούνται συνεχώς από ένα διαρκώς άγρυπνο ανοσοποιητικό σύστημα και ότι αυτή η

ανοσολογική απόκριση είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και την εξάλειψη της συντριπτικής πλειονότητας των αρχικών καρκινικών κυττάρων και επομένως των νέων όγκων. Σύμφωνα με αυτήν τη λογική, οι συμπαγείς όγκοι που εμφανίζονται κατά κάποιον τρόπο κατάφεραν να αποφύγουν την ανίχνευση από το ανοσοποιητικό σύστημα ή κατάφεραν να περιορίσουν την έκταση της ανοσολογικής θανάτωσης, αποφεύγοντας έτσι την εξάλειψη. Επομένως η ανοσοαποφυγή παρουσιάζεται ως ένα άλλο αναδυόμενο σήμα κατατεθέν των καρκινικών κυττάρων [7].

Η κακή αγγείωση οδηγεί σε υποξική απόκριση και αυτή με τη σειρά της σε αυξημένη γλυκολυτική δραστηριότητα του όγκου και επιπρόσθετη εναπόθεση γαλακτικού. Η συσσώρευση γαλακτικού οξινίζει το μικροπεριβάλλον του όγκου, το οποίο επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο το ανοσοποιητικό σύστημα αναγνωρίζει και ανταποκρίνεται στον όγκο. Επιπλέον, ο περιορισμός των θρεπτικών συστατικών παρέχει ένα πλαίσιο στο οποίο τα ανοσοποιητικά, τα στρωματικά και τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να ανταγωνίζονται για θρεπτικά συστατικά για τη διεξαγωγή βιοσύνθεσης, βιοενεργητικών και τελεστικών δραστηριοτήτων. Τα ανοσοκύτταρα τείνουν να είναι λιγότερο προσαρμοσμένα για τον ανταγωνισμό των θρεπτικών συστατικών και αυτός είναι ένας βασικός μηχανισμός ρύθμισης της ανοσίας κατά του όγκου [11].

1.2.10 Η ενεργοποίηση της φαινοτυπικής πλαστικότητας

Η οργανογένεση, δηλαδή η διαδικασία κατά την οποία οι ιστοί διαφοροποιούνται και αναλαμβάνουν ομοιοστατικές λειτουργίες, χαρακτηρίζεται από τελική διαφοροποίηση, όπου τα προγονικά κύτταρα σταματούν να αναπτύσσονται. Το τελικό αποτέλεσμα της κυτταρικής διαφοροποίησης είναι στις περισσότερες περιπτώσεις αντιπολλαπλασιαστικό και αποτελεί σαφές εμπόδιο στον συνεχιζόμενο πολλαπλασιασμό που είναι απαραίτητος για τη νεοπλασία. Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι η ενεργοποίηση της κανονικά περιορισμένης ικανότητας για φαινοτυπική πλαστικότητα προκειμένου να αποφευχθεί ή να ξεφύγει από την κατάσταση της τελικής διαφοροποίησης είναι ένα κρίσιμο συστατικό της παθογένεσης του καρκίνου. Τα νεογένητα καρκινικά κύτταρα που προέρχονται από ένα φυσιολογικό κύτταρο που είχε τεθεί ήδη προς διαφοροποίηση μπορούν να αντιστρέψουν την πορεία τους πίσω σε καταστάσεις που μοιάζουν με προγονικά κύτταρα. Αντίθετα, τα νεοπλασματικά κύτταρα που προκύπτουν από ένα προγονικό κύτταρο που προορίζεται να ακολουθήσει μια οδό διαφοροποίησης τελικού σταδίου μπορεί να σταματήσει τη διαδικασία, διατηρώντας τα επεκτεινόμενα καρκινικά κύτταρα σε μια μερικώς διαφοροποιημένη, προγονική κατάσταση. Εναλλακτικά, μπορεί να λειτουργήσει η διαφοροποίηση, στην οποία κύτταρα που αρχικά είχαν δεσμευτεί σε ένα μονοπάτι διαφοροποίησης μεταπηδούν σε ένα εντελώς διαφορετικό αναπτυξιακό πρόγραμμα, αποκτώντας έτσι χαρακτηριστικά ειδικά για τον ιστό που δεν είχαν προκαθοριστεί από τα φυσιολογικά κύτταρα προέλευσης τους (**Εικόνα 4**). Τα ακόλουθα παραδείγματα υποστηρίζουν το επιχείρημα ότι διαφορετικές μορφές κυτταρικής πλαστικότητας, όταν λαμβάνονται μαζί, αποτελούν μια λειτουργικά διακριτή ικανότητα σήματος. Ως εκ τούτου, αυτές οι τρεις υποκατηγορίες φαινοτυπικής πλαστικότητας - αποδιαφοροποίηση ώριμων κυττάρων πίσω σε προγονικές καταστάσεις, παρεμπόδιση διαφοροποίησης για διακοπή αναπτυσσόμενων κυττάρων σε καταστάσεις προγονικών/βλαστικών κυττάρων και διαφοροποίηση σε εναλλακτικές κυτταρικές σειρές - φαίνεται να λειτουργούν σε πολλαπλούς τύπους καρκίνου κατά τη διάρκεια του σχηματισμού όψιμου όγκου, της κακοήθους εξέλιξης και/ή της ανταπόκρισης στη θεραπεία [2].



Εικόνα 4: Ενεργοποίηση της φαινοτυπικής πλαστικότητας. Αριστερά, φαίνεται ότι η φαινοτυπική πλαστικότητα είναι αναμφισβήτητη μια επίκτητη ικανότητα που επιτρέπει διάφορες διαταραχές της κυτταρικής διαφοροποίησης. Δεξιά, απεικονίζονται τρεις εξέχοντες τρόποι διαταραγμένης διαφοροποίησης που αποτελούν αναπόσπαστο μέρος του καρκίνου [2].

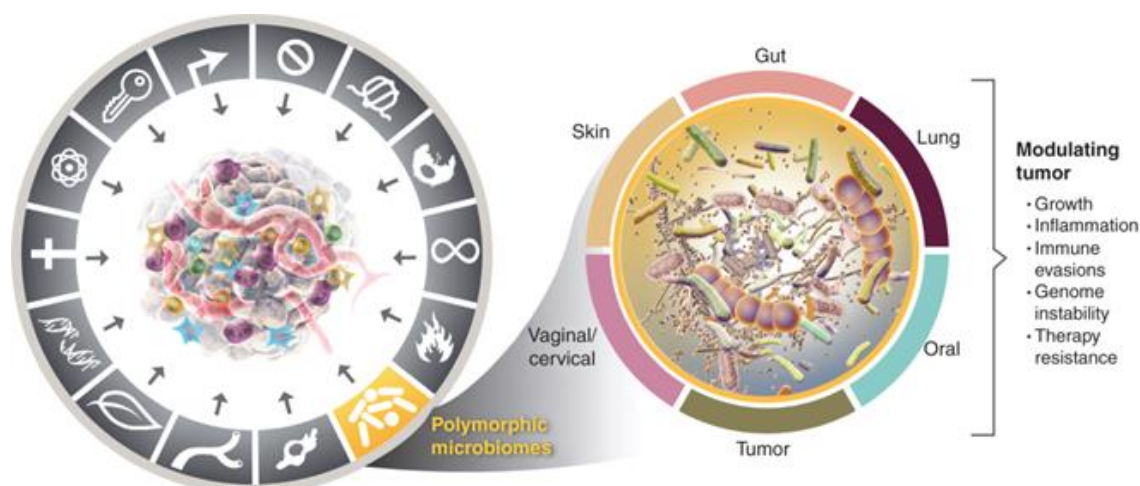
1.2.11 Ο επιγενετικός επαναπρογραμματισμός που δεν οφείλεται σε μεταλλάξεις

Το χαρακτηριστικό της αστάθειας και της μετάλλαξης του γονιδιώματος (DNA) είναι θεμελιώδες συστατικό του σχηματισμού και της παθογένεσης του καρκίνου. Επί του παρόντος, πολλές μεταλλάξεις στο γονιδίωμα των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων, οδηγούν σε κάθε τύπο ανθρώπινου καρκίνου, σε διαφορετικά στάδια κακοήθους εξέλιξης, συμπεριλαμβανομένων των μεταστάσεων, και κατά την ανάπτυξη προσαρμοστικής αντίστασης στη θεραπεία. Επιπροσθέτως, υπάρχει ένας άλλος φαινομενικά ανεξάρτητος τρόπος επαναπρογραμματισμού γονιδιώματος που περιλαμβάνει καθαρά επιγενετικά ρυθμιζόμενες αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, και θα μπορούσε να ονομαστεί «μη μεταλλαγμένος επιγενετικός επαναπρογραμματισμός».

Αυτές οι αλλαγές στο γονιδίωμα μπορεί να οφείλονται στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Οι ευεργετικές αλλαγές για τη φαινοτυπική επιλογή των δυνατοτήτων των σημάτων μπορούν να οδηγήσουν σε κλωνική ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων με ενισχυμένη ικανότητα για πολλαπλασιαστική επέκταση. Για παράδειγμα, ένα κοινό χαρακτηριστικό των όγκων (ή των περιοχών εντός των όγκων) είναι η υποξία- συνέπεια της ανεπαρκούς αγγείωσης. Η υποξία, για παράδειγμα, μειώνει τη δραστηριότητα των απομεθυλασών, με αποτέλεσμα την υπερμεθυλίωση. Επίσης, η ανεπαρκής αγγείωση πιθανότατα περιορίζει επίσης τη βιοδιαθεσιμότητα των κρίσιμων θρεπτικών συστατικών που μεταδίδονται στο αίμα και η στέρηση θρεπτικών ουσιών έχει αποδειχθεί για παράδειγμα ότι μεταβάλλει τον μεταφραστικό έλεγχο και κατά συνέπεια ενισχύει τον κακοήγη φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Ταυτόχρονα μπορεί να υπάρχει επιγενετική ετερογένεια που δεν βασίζεται σε μεταλλάξεις. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα περιλαμβάνει τη συνδετική ιστόνη H1.0, η οποία εκφράζεται δυναμικά και συγκρατείται σε υποπληθυσμούς καρκινικών κυττάρων εντός ενός αριθμού τύπων όγκων, με την επακόλουθη δέσμευση σε μεγάλες περιοχές του γονιδιώματος συμπεριλαμβανομένων εκείνων που μεταφέρουν πολύ σημαντικές ιδιότητες. Τέλος, πιστεύεται ότι τα βοηθητικά κύτταρα στο μικροπεριβάλλον του όγκου - ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο, έμφυτα ανοσοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα και περικύτταρα του αγγειακού συστήματος του όγκου - επαναπρογραμματίζονται επιγενετικά κατά την πρόσληψή τους από παράγοντες που καθορίζουν το μικροπεριβάλλον του συμπαγούς όγκου [2].

1.2.12 Τα πολυμορφικά μικροβιώματα

Οι μικροοργανισμοί που συμβιωτικά συνδέονται με τους ιστούς – φραγμούς του σώματος που εκτίθενται στο εξωτερικό περιβάλλον - την επιδερμίδα και τον εσωτερικό βλεννογόνο, ειδικότερα του γαστρεντερικού σωλήνα, καθώς και του πνεύμονα, του μαστού και του ουροποιητικού συστήματος. Υπάρχει αυξανόμενη εκτίμηση ότι τα οικοσυστήματα που δημιουργούνται από βακτήρια και μύκητες -τα μικροβιώματα- έχουν βαθύ αντίκτυπο στην υγεία και τις ασθένειες. Για τον καρκίνο, τα στοιχεία είναι ολοένα και πιο πειστικά ότι η πολυμορφική μεταβλητότητα στα μικροβιώματα σε έναν κυτταρικό πληθυσμό μπορεί να έχει βαθιά επίδραση στους φαινοτύπους του καρκίνου. Μελέτες συσχέτισης σε ανθρώπους και σε πειραματικά μοντέλα καρκίνου σε ποντίκια αποκαλύπτουν συγκεκριμένους μικροοργανισμούς, κυρίως αλλά όχι αποκλειστικά βακτήρια, που μπορεί να έχουν προστατευτικές ή επιβλαβείς επιδράσεις στην ανάπτυξη καρκίνου, την κακοήγη εξέλιξη και την ανταπόκριση στη θεραπεία (**Εικόνα 5**). Ένα παράδειγμα είναι η μεταλλαξιγένεση του επιθηλίου του παχέος εντέρου, ως αποτέλεσμα της παραγωγής βακτηριακών τοξινών και άλλων μορίων που είτε βλάπτουν άμεσα το DNA είτε διαταράσσουν τα συστήματα που διατηρούν τη γονιδιωματική ακεραιότητα. Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο συγκεκριμένα βακτηριακά είδη προάγουν την ογκογένεση περιλαμβάνει βακτήρια που παράγουν βουτυρικό, των οποίων η αφθονία είναι αυξημένη σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου. Η παραγωγή του μεταβολίτη βουτυρικού οξέος έχει πολύπλοκα αποτελέσματα, συμπεριλαμβανομένης της επαγωγής γηρασμένων επιθηλιακών και ινοβλαστικών κυττάρων.

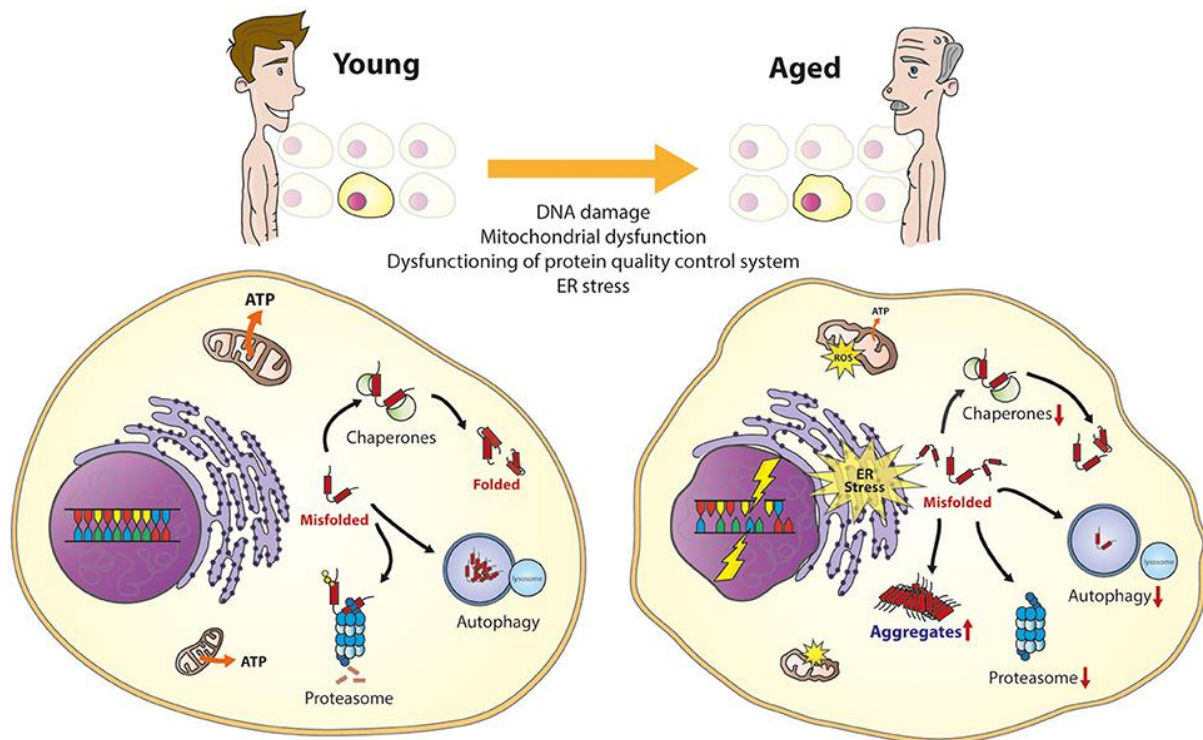


Εικόνα 5 :Πολυμορφικό μικροβίωμα. Τα μικροβιώματα πολλών ιστών εμπλέκονται στη ρύθμιση των φαινοτύπων του όγκου. Εκτός από το ευρέως μελετημένο μικροβίωμα του εντέρου, άλλα διακριτικά μικροβιώματα ιστού, καθώς και το μικροβίωμα του όγκου, εμπλέκονται στη ρύθμιση της απόκτησης - τόσο θετικά όσο και αρνητικά - των απεικονιζόμενων χαρακτηριστικών ικανοτήτων σε ορισμένους τύπους όγκων [2].

1.2.13 Τα γηρασμένα κύτταρα

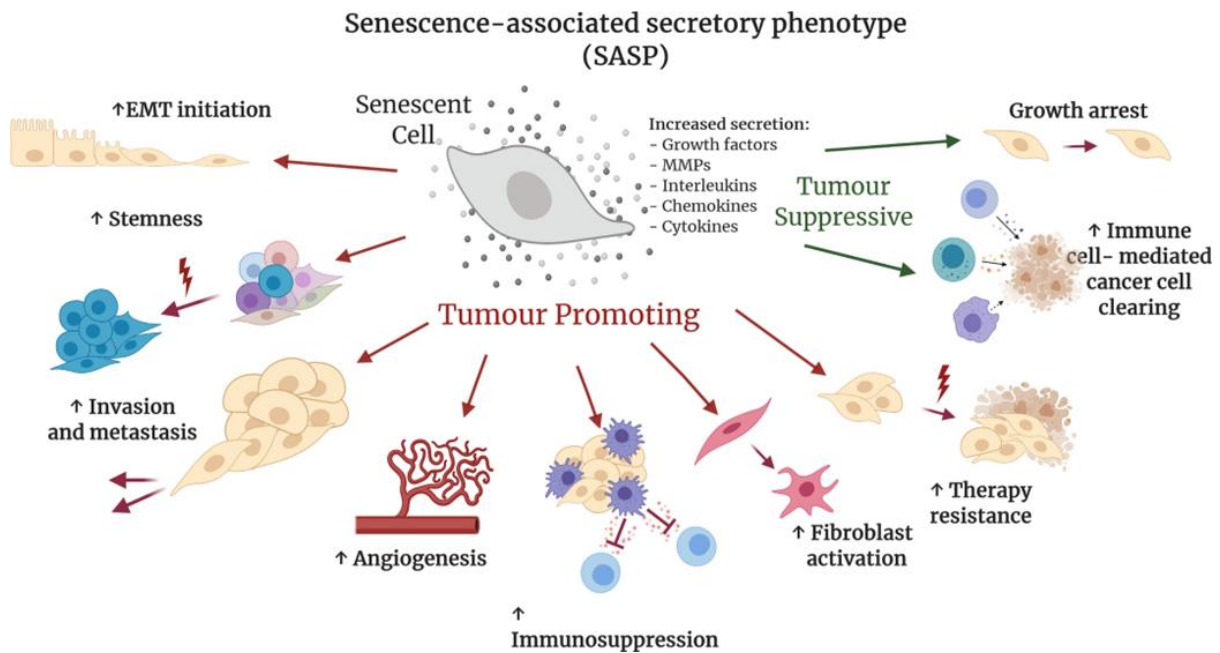
Η κυτταρική γήρανση είναι μια τυπικά μη αναστρέψιμη μορφή πολλαπλασιαστικής διακοπής, που πιθανότατα λειτουργεί σαν συμπληρωματικός μηχανισμός στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Εκτός από τον τερματισμό του κύκλου κυτταρικής διαίρεσης, η γήρανση προκαλεί αλλαγές στη μορφολογία και τον μεταβολισμό των κυττάρων και, πιο συγκεκριμένα, την ενεργοποίηση ενός εκκριτικού φαινοτύπου που σχετίζεται με τη γήρανση (Senescence-Associated Secretory Phenotype, SASP) που περιλαμβάνει την απελευθέρωση μιας πληθώρας βιοδραστικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των χημειοκινών, των κυτοκινών και πρωτεασών των οποίων η ταυτότητα εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου και του ιστού από τον οποίο προκύπτει ένα γηρασμένο κύτταρο. Η γήρανση μπορεί να προκληθεί στα κύτταρα από μια ποικιλία συνθηκών,

συμπεριλαμβανομένων του μικροπεριβαλλοντικού στρες όπως η στέρηση θρεπτικών ουσιών και η βλάβη του DNA, καθώς και η βλάβη σε οργανίδια και ανισορροπίες στα δίκτυα κυτταρικής σηματοδότησης (**Εικόνα 6**).



Εικόνα 6: Το γηρασμένο κύτταρο. Σημαντικές κυτταρικές διεργασίες που επηρεάζονται κατά τη γήρανση και έχουν ως αποτέλεσμα αρκετούς κυτταρικούς φαινοτύπους, συμπεριλαμβανομένης της υπερφόρτωσης του συστήματος ποιοτικού ελέγχου πρωτεϊνών, της βλάβης του DNA, της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων και του στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER stress). Αποτέλεσμα αυτών είναι ο κυτταρικός θάνατος [12].

Η κυτταρική γήρανση θεωρούνταν ένας προστατευτικός μηχανισμός έναντι της νεοπλασίας, όπου τα καρκινικά κύτταρα υπόκεινται σε γήρανση [13]. Παρόλα αυτά σε ορισμένα πλαίσια, τα γηρασμένα κύτταρα διεγείρουν ποικιλοτρόπως την ανάπτυξη του όγκου και την κακοήγη εξέλιξη (**Εικόνα 7**). Ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο τα γηρασμένα κύτταρα προάγουν τους φαινοτύπους όγκου πιστεύεται ότι είναι το SASP, το οποίο είναι αποδεδειγμένα ικανό να μεταφέρει σηματοδοτικά μόρια, με παρακρινή τρόπο σε βιώσιμα κοντινά καρκινικά κύτταρα καθώς και σε άλλα κύτταρα στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Έτσι, σε διαφορετικά πειραματικά συστήματα, τα γηρασμένα καρκινικά κύτταρα έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλουν ποικιλοτρόπως στην πολλαπλασιαστική σηματοδότηση, αποφεύγοντας την απόπτωση, επάγοντας αγγειογένεση, διεγείροντας την μετάσταση και καταστέλλοντας την ανοσία του όγκου. Μια άλλη πτυχή των επιδράσεων των γηρασμένων καρκινικών κυττάρων στους καρκινικούς φαινοτύπους περιλαμβάνει παροδικές, αναστρέψιμες γηρασμένες κυτταρικές καταστάσεις, όπου τα γηρασμένα καρκινικά κύτταρα μπορούν να ξεφύγουν από τη μη πολλαπλασιαστική κατάστασή τους που εκφράζει SASP και να επαναλάβουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την εκδήλωση των σχετικών δυνατοτήτων πλήρως βιώσιμων ογκογόνων κυττάρων. Αυτή η παροδική γήρανση είναι πιο καλά τεκμηριωμένη σε περιπτώσεις αντίστασης στη θεραπεία, που αντιπροσωπεύει μια μορφή λήθαργου που παρακάμπτει τη θεραπευτική στόχευση πολλαπλασιαζόμενων καρκινικών κυττάρων, αλλά μπορεί να αποδειχθεί ευρύτερα λειτουργική σε άλλα στάδια ανάπτυξης όγκου, κακοήθους εξέλιξης και μετάστασης [2].



Εικόνα 7: Ο εκκριτικός φαινότυπος που σχετίζεται με τη γήρανση (SASP) εμφανίζει τόσο προαγωγικό όσο και κατασταλτικό ρόλο έναντι του όγκου. Τα γηρασμένα κύτταρα εκκρίνουν έναν αριθμό παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των αυξητικών παραγόντων, των μεταλλοπρωτεϊνών μήτρας, των ιντερλευκινών, των χημειοκινών και των κυτοκινών. Αυτά μπορούν να παίξουν πολυσύνθετους ρόλους στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Τα κόκκινα βέλη υπογραμμίζουν τους ρόλους που προάγουν τον όγκο, συμπεριλαμβανομένων της προώθησης της μετατροπής των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα, της πλαστικότητας του όγκου, της μετάστασης, της αγγειογένεσης, της ανοσοκαταστολής, της ενεργοποίησης των ινοβλαστών και της αντίστασης στη θεραπεία. Τα πράσινα βέλη υπογραμμίζουν τους ογκοκατασταλτικούς ρόλους του SASP, συμπεριλαμβανομένης της διακοπής του κυτταρικού κύκλου και της αύξησης της ανοσολογικής απόκρισης [14].

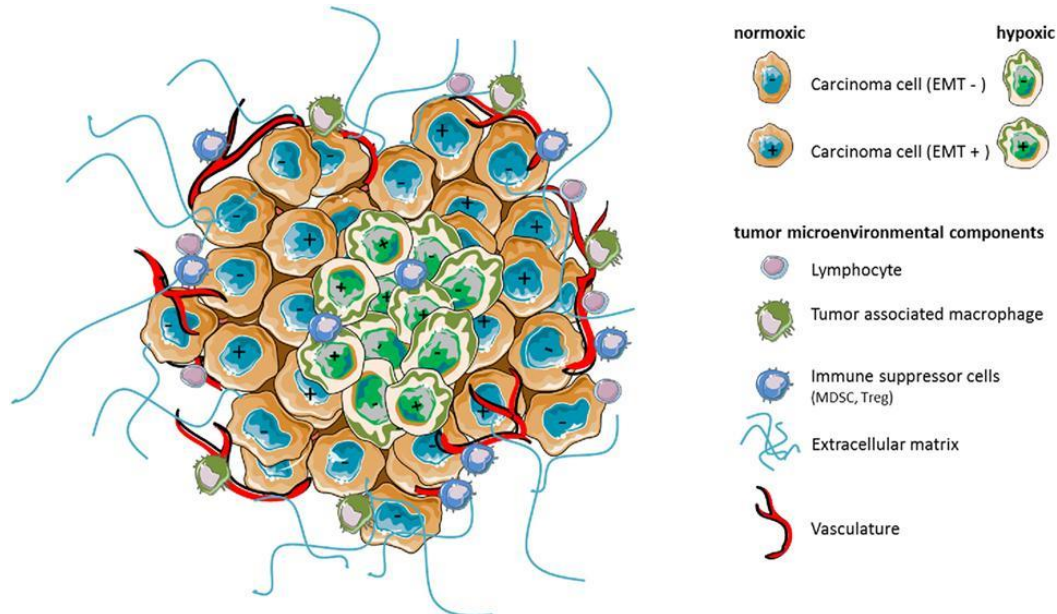
1.3 Το μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων

Η φυσιολογία των οργάνων χαρακτηρίζεται από εξαιρετική οργάνωση όπου το κάθε είδος κυττάρου διαθέτει συγκεκριμένο ρόλο και λειτουργίες. Πιο συγκεκριμένα, τα μεσεγχυματικά κύτταρα σχηματίζουν τα διάφορα όργανα και καθορίζουν τη λειτουργία τους. Αυτά υποστηρίζονται από τα κύτταρα του συνδετικού ιστού, ο οποίος διατηρεί τα δομικά θεμέλια και ενσωματώνει τα συστήματα οργάνων. Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος διαθέτουν προστατευτικό ρόλο και θεραπεύουν τον οργανισμό μετά από κάποιο τραυματισμό. Αντίθετα, οι συμπαγείς όγκοι είναι άκρως αποδιοργανωμένες μορφές φυσιολογικών οργάνων, στρατολογημένες με πολλούς τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων ενδοθηλιακών κυττάρων (π.χ. αιμοφόρων αγγείων), στρωματικών ινοβλαστών, ανοσοκυττάρων και κακοήθων καρκινικών κυττάρων. Το σύνολο αυτό των κυττάρων δημιουργεί ένα μικροπεριβάλλον του όγκου που θέτει πολλές προκλήσεις για τα καρκινικά κύτταρα. Η φυσική πίεση, το οξειδωτικό στρες, η στέρηση θρεπτικών ουσιών και ο ανταγωνισμός, η υποξία και η ανοσολογική απόκριση είναι κάποιες από αυτές τις προκλήσεις που τίθενται να αντιμετωπίσουν τα καρκινικά κύτταρα. Έτσι, τα κύτταρα που σχετίζονται με τον όγκο επαναπρογραμματίζουν τον μεταβολισμό τους και τείνουν να ευδοκούν σε ένα περιβάλλον όπου επικρατούν συνθήκες υποξίας, χαμηλότερο pH και οξειδωτική ή/και μηχανική πίεση [11, 15].

1.3.1 Υποξικές συνθήκες

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν τα αιμοφόρα αγγεία. Αυτά είναι κρίσιμα για την παροχή οξυγόνου, θρεπτικών συστατικών και φαρμάκων στον όγκο. Επιπλέον, παρέχουν μια οδό αποβολής για τα μεταβολικά απόβλητα και τα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα. Σε αντίθεση με το φυσιολογικό αγγειακό σύστημα, τα αγγεία του όγκου συχνά δεν είναι οργανωμένα οδηγώντας σε

τοπικές διακυμάνσεις στην οξυγόνωση του όγκου και σε άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες (**Εικόνα 8**). Η μετάβαση από την οξειδωτική φωσφορυλίωση στη γλυκόλυση θεωρείται μια από τις στρατηγικές προσαρμογής των καρκινικών κυττάρων για να επιβιώσουν σε υποξικές συνθήκες. Ένα υποπροϊόν αυτού είναι τα αυξημένα επίπεδα γαλακτικού και επομένως το χαμηλότερο εξωκυτταρικό pH, που είναι χαρακτηριστικό των όγκων.



Εικόνα 8: Η υποξία ως κύριο συστατικό του μικροπεριβάλλοντος του όγκου διαμορφώνει την ετερογένεια του όγκου. Οι όγκοι περιέχουν διαφορετικούς τύπους κυττάρων που συλλογικά επιτρέπουν την ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου. Πολλαπλοί τύποι στρωματικών κυττάρων, δημιουργούν μικροπεριβαλλοντικές συνθήκες που αλλάζουν καθώς ο όγκος μεγαλώνει. Ειδικότερα, η υποξία που προκαλείται από ανεπαρκή συγκέντρωση οξυγόνου μπορεί να επηρεάσει τον φαινότυπο ορισμένων καρκινικών κυττάρων οδηγώντας δυνητικά σε αυξημένη ετερογένεια του πληθυσμού των καρκινικών κυττάρων και εγγενή αντίσταση στην αντικαρκινική ανοσία [16].

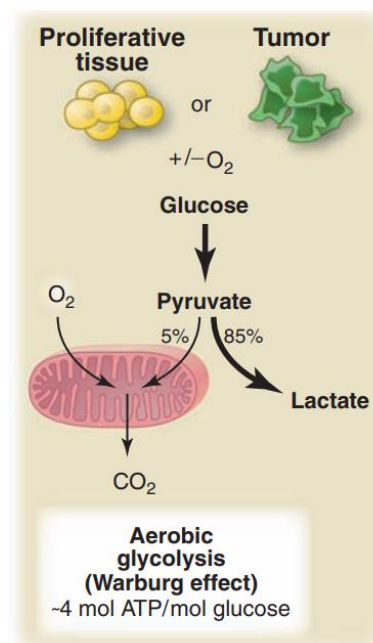
Πιο αναλυτικά, οι κακοήθεις συμπαγείς όγκοι αναπτύσσονται ταχέως με ανεπαρκή αγγείωση, οδηγώντας σε ανισορροπία μεταξύ της κατανάλωσης οξυγόνου και της παροχής οξυγόνου στα καρκινικά κύτταρα. Αυτή η ανισορροπία και η περιορισμένη διάχυση του μοριακού οξυγόνου από τα αιμοφόρα αγγεία του όγκου, προκαλούν ένα ειδικό περιβάλλον για τον όγκο, την υποξία. Οι περισσότεροι κακοήθεις όγκοι κατά συνέπεια αναπτύσσονται ως συγκρότημα κλώνων μικρού όγκου, σε καθένα από τα οποία ένα αιμοφόρο αγγείο περιβάλλεται από καλά οξυγονωμένα (νορμοξικά), ανεπαρκή σε οξυγόνο (υποξικά) και τελικά μη οξυγονωμένα (ανοξικά / νεκρωτικά) καρκινικά κύτταρα [17].

Τα καρκινικά κύτταρα προσαρμόζονται σε συνθήκες χαμηλού οξυγόνου προκαλώντας την έκφραση ενός παράγοντα μεταγραφής, του επαγωγίμου από υποξία παράγοντα 1 [Hypoxia-inducible factor-1, (HIF-1)]. Το HIF-1 είναι ένα ετεροδιμερές που αποτελείται από HIF-1α και HIF-1β υπομονάδες. Ενώ η HIF-1β εκφράζεται εντατικά, η έκφραση και η δραστηριότητα ενεργοποίησης της υπομονάδας HIF-1α είναι γνωστό ότι προκαλούνται από υποξικά ερεθίσματα. Το HIF-1 συνδέεται με την αλληλουχία του συγγενικού ενισχυτή, το στοιχείο απόκρισης υποξίας (hypoxia response element, HRE) και προκαλεί την έκφραση διαφόρων γονιδίων που σχετίζονται με:

- την προσαρμογή του κυτταρικού μεταβολισμού στην υποξία (αλλαγή από οξειδωτική σε αναερόβια αναπνοή: μεταβολικός επαναπρογραμματισμός),
- την διαφυγή από υποξία (μετάσταση καρκινικών κυττάρων) και
- την βελτίωση της υποξίας (αγγειογένεση) [17].

1.3.2 Το φαινόμενο Warburg

Η γλυκόζη είναι ένα απλό σάκχαρο που λειτουργεί κυρίως ως πηγή ενέργειας παρέχοντας τριφωσφορική αδενοσίνη (Adenosine Triphosphate, ATP). Η διαθεσιμότητα γλυκόζης σε έναν κακοήγη στερεό όγκο είναι ένας από τους τοπικούς ρυθμιστές που επηρεάζουν την ανάπτυξη μεμονωμένων καρκινικών κυττάρων και την πρόοδο ολόκληρων όγκων. Λόγω της περιορισμένης απόστασης που η γλυκόζη καθώς και το οξυγόνο μπορούν να διαχέονται από τα αιμοφόρα αγγεία του όγκου, τα καρκινικά κύτταρα, που βρίσκονται μακρύτερα από τα αιμοφόρα αγγεία δεν μπορούν να πάρουν αρκετή γλυκόζη. Έτσι τα καρκινικά κύτταρα μετατοπίζουν τη μεταβολική τους οδό από τη μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση στη γλυκόλυση και τη ζύμωση γαλακτικού οξέος. Έτσι προσαρμόζουν τη ζήτηση σε οξυγόνο. Σε περιοχές υποξικού όγκου τα καρκινικά κύτταρα μεταβολίζουν, τη γλυκόζη μέσω αναερόβιας γλυκόλυσης. Αυτή η διαδικασία υποστηρίζεται από καλά οξυγονωμένα καρκινικά κύτταρα, τα οποία καταναλώνουν γαλακτικό που απορρίπτονται από τα υποξικά καρκινικά κύτταρα για να τροφοδοτήσουν το μιτοχονδριακό μεταβολισμό (**Εικόνα 9**). Αυτό χαρακτηρίζεται ως φαινόμενο Warburg (1956) [1, 17].



Εικόνα 9: Το φαινόμενο Warburg [1].

1.3.3 Το όξινο περιβάλλον

Βέβαια αυτό επηρεάζει και την τιμή pH στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Ενώ το ενδοκυτταρικό pH των κυττάρων εντός υγιών ιστών και όγκων είναι παρόμοιο, οι όγκοι εμφανίζουν χαμηλότερο εξωκυτταρικό pH από τους φυσιολογικούς ιστούς. Κατά συνέπεια, το μέσο εξωκυτταρικό pH του όγκου να κυμαίνεται μεταξύ 6.0 και 7.0 ενώ σε φυσιολογικούς ιστούς και στο αίμα, το εξωκυτταρικό pH είναι σταθερό με τιμή περίπου 7.4 (7.35-7.45). Η διαφορά αυτή οφείλεται κυρίως στο υψηλό ποσοστό αναερόβιας γλυκόλυσης στα υποξικά καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, για να διατηρηθεί ένας υψηλός γλυκολυτικός ρυθμός απαιτείται το πυροσταφυλικό να μετατραπεί σε γαλακτικό για να παράγει κατιόντα νικοτιναμιδικής αδενίνης (Nicotinamide adenine dinucleotide ion, NAD⁺), έναν παράγοντα που απαιτείται από διαφορετικά γλυκολυτικά ένζυμα. Το ίδιο το γαλακτικό οξύ πρέπει να απομακρυνθεί από το κύτταρο για να ευνοήσει τη μεταβολική ροή και να αποφύγει την ανάπτυξη κυτταροτοξικότητας. Ο μεταφορέας μονοκαρβοξυλικού θα εξαγάγει ένα πρωτόνιο μαζί με ένα γαλακτικό μόριο, οδηγώντας σε προοδευτική οξίνιση του εξωκυτταρικού χώρου του όγκου (και ελαφρά αλκαλοποίηση του κυτταρικού). Η επαγόμενη από υποξία έκφραση της καρβονικής ανυδράσης IX (carbonic anhydrase CA IX) θα συμβάλει, επίσης, στην επιδείνωση της διαβάθμισης του pH μεταξύ των ενδο- και εξωκυτταρικών διαμερισμάτων μέσω της μετατροπής του CO₂ σε όξινο ανθρακικό άλας διαταράσσοντας την ισορροπία: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ [18]

1.3.4 Αυξημένη συγκέντρωση δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου

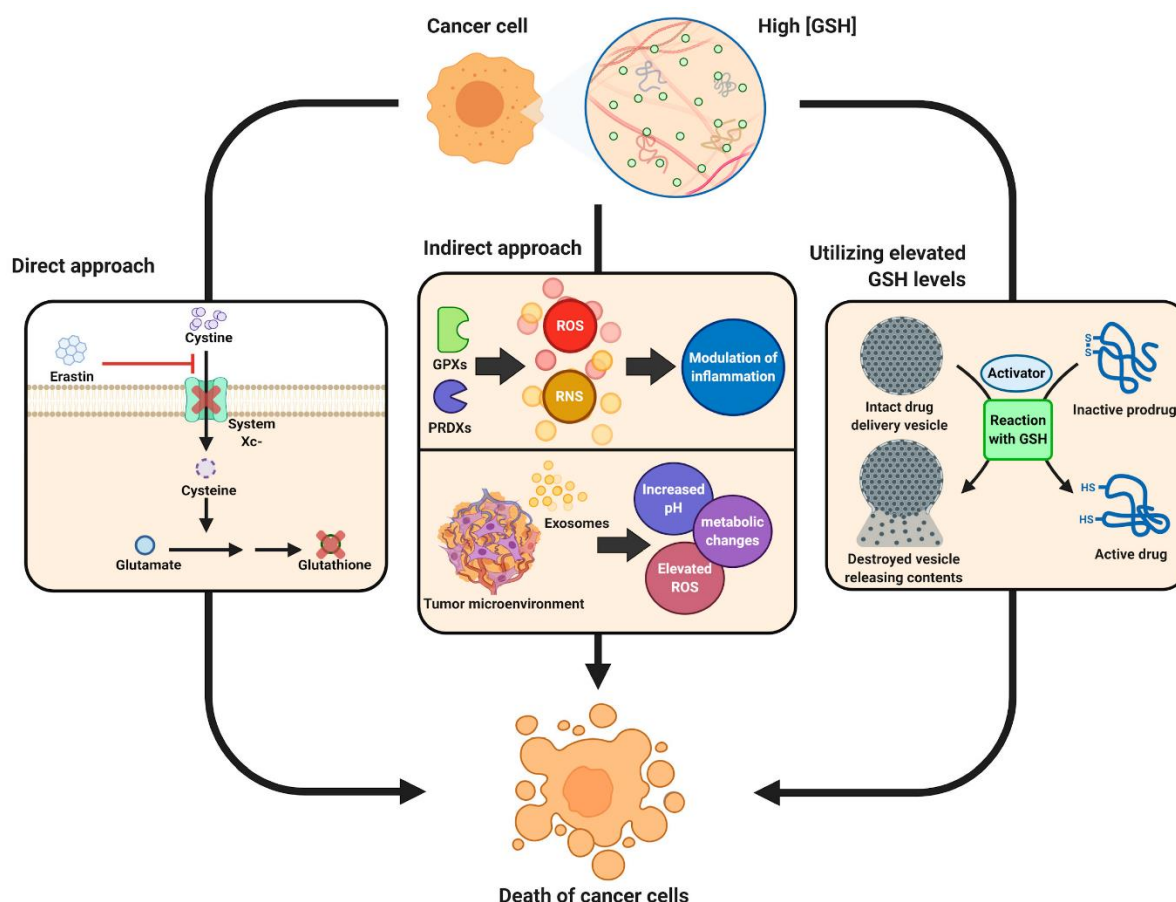
Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS) είναι υποπροϊόντα του ενδογενούς αερόβιου μεταβολισμού. Περιλαμβάνουν το ανιόν υπεροξειδίου (O₂⁻), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), και ρίζες υδροξυλίου (HO·), υπεροξειδικές ρίζες (ROO·), αλκοξειδικές ρίζες (RO·), απλό μοριακό οξυγόνο (¹O₂), και υποχλωριώδη ιόντα (·OCl). Συνδέονται συχνά με την αρχή του οξειδωτικού στρες, το οποίο υποδηλώνει ότι προκαλούν παθολογία καταστρέφοντας τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και το DNA. Ωστόσο, τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχει καταστεί προφανές ότι τα ROS χρησιμεύουν επίσης ως μόρια σηματοδότησης για τη ρύθμιση βιολογικών και φυσιολογικών διεργασιών. Ο «υπερ-μεταβολισμός» των καρκινικών κυττάρων προκαλεί άφθονη παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο, καθώς και από τη δράση των NADPH οξειδωτών.

Οι αρχικές παρατηρήσεις πριν από δύο δεκαετίες έδειξαν ότι τα καρκινικά κύτταρα παράγουν υψηλότερα επίπεδα ROS από τα φυσιολογικά κύτταρα. Είχε υιοθετηθεί η άποψη ότι τα αυξημένα επίπεδα ROS προκαλούσαν γονιδιωματική αστάθεια και έτσι προωθούσαν την ογκογένεση. Τέλος, τα ROS συμβάλλουν στη γήρανση μέσω της δραστηριότητάς τους έναντι των κυτταρικών μακρομορίων, ιδιαίτερα τα μιτοχόνδρια. Τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια, λόγω της ανεπαρκούς οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, παράγουν αυξανόμενες ποσότητες ROS, αναπόφευκτα βλάπτοντας την κυτταρική λειτουργία [19].

Μια άλλη σημαντική κατηγορία χημικώς δραστικών ουσιών είναι οι μορφές δραστικού αζώτου (Reactive nitrogen species, RNS), τα οποία περιλαμβάνουν το μονοξείδιο του αζώτου (NO), το διοξείδιο του αζώτου (NO₂), το υπεροξυνιτρώδες (ONOO⁻) και το νιτροσύλιο (HNO). Το μονοξείδιο του αζώτου παράγεται σε διάφορα κύτταρα από τη δράση τριών διαφορετικών ισομορφών συνθάσης οξειδίου του αζώτου. Ρυθμίζει τα καρδιαγγειακά, νευρικά και ανοσοποιητικά συστήματα καθώς επίσης εμπλέκεται σε παθολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, του νευροεκφυλιστικού τραυματισμού και της φλεγμονής. Το υπεροξυνιτρώδες παράγεται από τη μη ενζυματική αντίδραση του NO με O₂⁻. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το ONOO⁻ βρίσκεται σε ισορροπία με την πρωτονιωμένη του μορφή (ONOOH), η οποία αποσυντίθεται γρήγορα για να παράγει OH και διοξείδιο του αζώτου (NO₂), και οι δύο παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες [20].

1.3.5 Αυξημένη συγκέντρωση γλουταθειόνης

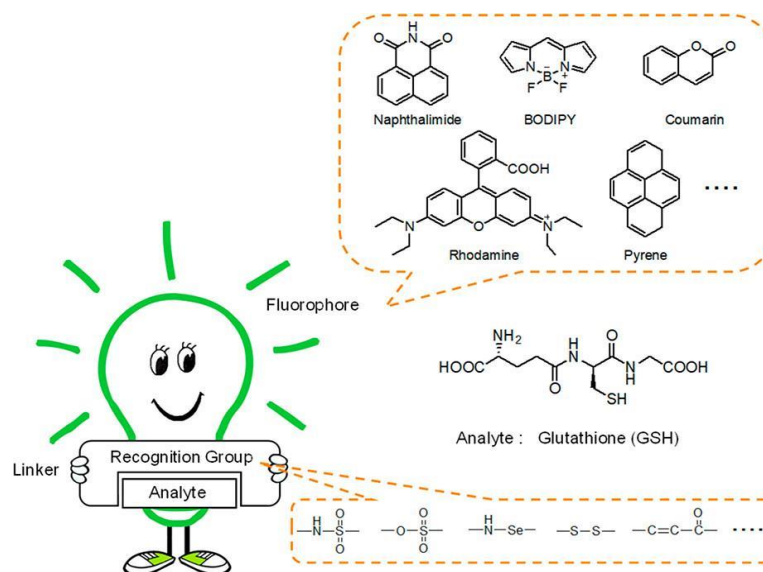
Η γλουταθειόνη (Glutathione, γ-glutamyl-cysteinyl-glycine; GSH) είναι η πιο άφθονη θειόλη χαμηλού μοριακού βάρους και το δισουλφίδιό της είναι το κύριο ζεύγος οξειδοαναγωγής στα κύτταρα των θηλαστικών. Η σύνθεση της GSH από γλουταμικό, κυστεΐνη και γλυκίνη καταλύεται διαδοχικά από δύο κυτοσολικά ένζυμα, τη συνθετάση της γ-γλουταμυλκυστεΐνης (γ-glutamylcysteine synthetase), και τη συνθετάση γλουταθειόνης. Η GSH παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα, στον μεταβολισμό των θρεπτικών συστατικών και στη ρύθμιση των κυτταρικών διεργασιών (συμπεριλαμβανομένης της γονιδιακής έκφρασης, της σύνθεσης DNA και πρωτεϊνών, του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης των κυττάρων, της μεταγωγής σήματος, της παραγωγής και της ανοσολογικής απόκρισης κυτοκίνης). Η ανεπάρκεια γλουταθειόνης συμβάλλει στο οξειδωτικό στρες, το οποίο παίζει βασικό ρόλο στη γήρανση και στην παθογένεση πολλών ασθενειών (συμπεριλαμβανομένου επιληπτικών κρίσεων, νόσου Alzheimer, νόσου Parkinson, ηπατικής νόσου, κυστικής ίνωσης, δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, HIV, AIDS, καρκίνου, καρδιακής προσβολής, και διαβήτη) [21].



Εικόνα 10: Διαφορετικές προσεγγίσεις για τη θεραπεία του καρκίνου που σχετίζονται με τις λειτουργίες της γλουταθειόνης. Τα υψηλά επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) που παρατηρούνται στην πλειονότητα των όγκων σε συνδυασμό με τον ρόλο της στην ογκογένεση, την απόκριση της φλεγμονής και τις ιδιότητες του μικροπεριβάλλοντος του όγκου διερευνώνται για διαφορετικές θεραπευτικές προσεγγίσεις. Οι άμεσες προσεγγίσεις στοχεύουν στην παρεμπόδιση της σύνθεσης της GSH που οδηγεί σε φερρόπτωση των κυττάρων ή πιο αποτελεσματική χημειοθεραπεία. Οι έμμεσες μέθοδοι στοχεύουν στην απόκριση της φλεγμονής ή στο μικροπεριβάλλον του όγκου, προκειμένου να γίνουν οι όγκοι πιο ευαίσθητοι στην απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και στις ανοσοθεραπείες. Αυξημένα επίπεδα GSH και πιθανώς άλλα ενεργά μόρια σε καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούνται στην προσέγγιση προφάρμακου, όπου το φάρμακο ενεργοποιείται μόνο αφού εισέλθει στα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιώντας GSH στην αντίδραση ενεργοποίησης ή εξουδετερώνοντάς την μετά από ενεργοποίηση με άλλους παράγοντες [22].

Πιο αναλυτικά, η GSH προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες ανάγοντας τους δισουλφιδικούς δεσμούς των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών σε κυστεΐνες. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, η GSH οξειδώνεται σε δισουλφίδιο γλουταθειόνης (GSSG). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η GSH υπάρχει σχεδόν αποκλειστικά στην ανηγμένη της μορφή λόγω της εντατικής δραστηριότητας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης στα κύτταρα. Οι S-τρανσφεράσες γλουταθειόνης είναι ένζυμα αποτοξίνωσης που καταλύουν τη σύνδεση της GSH με μια ποικιλία εξωγενών και ενδογενών ηλεκτρονιόφιλων ενώσεων. Τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν αυξημένες ποσότητες GSH και S-τρανσφερασών γλουταθειόνης. Ως εκ τούτου, έχει τόσο προστατευτικό όσο και παθογόνο ρόλο. Αν και στα υγιή κύτταρα είναι ζωτικής σημασίας, τα αυξημένα επίπεδα GSH στα καρκινικά κύτταρα συνδέονται με την εξέλιξη του όγκου και την αυξημένη αντίσταση στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Πρόσφατα, έχουν αναπτυχθεί αρκετές νέες θεραπείες για να στοχεύσουν το αντιοξειδωτικό σύστημα GSH σε όγκους ως μέσο για αυξημένη ανταπόκριση και μειωμένη αντοχή στα φάρμακα (Εικόνα 10) [22-25]. Αυτοί βασίζονται σε ειδικά ανταποκρινόμενους συνδέτες ή ομάδες που ανταποκρίνονται σε βιοθειόλες, π.χ. αλδεΐδη, ακρυλικό, διπλός δεσμός, άτομα αλογόνου, δισουλφιδικός δεσμός, δεσμός αιθέρα, κ.λπ., συνδεόμενοι σε διάφορα ευρέως

διαδεδομένα φθοροφόρα π.χ. ναφθαλιμίδιο, πυρένιο, λουσιφερίνη, ροδαμίνη, κουμαρίνη, βόριο-διπυρρομεθένιο (BODIPY) κ.λπ. **(Εικόνα 11)**.



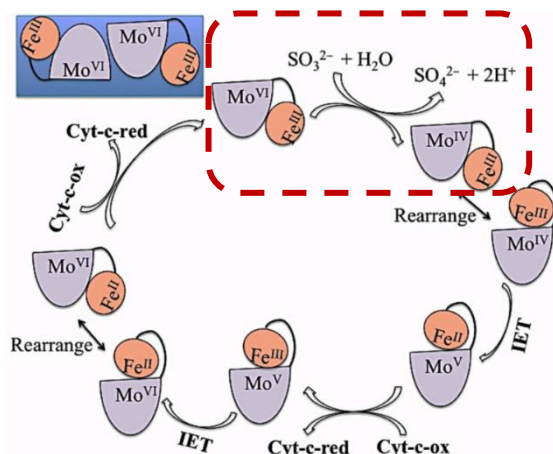
Εικόνα 11: Διάγραμμα δομής ανιχνευτών φθορισμού για GSH [24].

1.3.6 Υπερέκφραση ενζύμων

Η υπερέκφραση συγκεκριμένων ενζύμων που: α) εκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα (η τυροσινάση, η αλκαλική φωσφατάση, η β-γαλακτοσιδάση, οι νιτροαναγωγάσες, θειώδους, κ.ο.κ.) και β) καταλύουν συγκεκριμένες λειτουργίες, έχει τεθεί ως στόχος διάγνωσης και θεραπείας μέσω νέων μικρών μορίων που στοχεύουν αυτά τα ένζυμα [26].

1.3.6.1 Οξείδωση θειώδους

Η οξειδάση θειώδους (Sulfite oxidase, SO, EC 1.8.3.1) είναι ένα ένζυμο, που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια των ευκαριωτικών οργανισμών και αποτελεί έναν από τους βιοδείκτες της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η οξειδάση θειώδους αποτελεί ένα μεταλλοένζυμο εξαρτώμενο από μολυβδαίνιο που περιέχει δύο οξειδοαναγωγικά κέντρα, έναν συμπαραάγοντα μολυβδοπτερίνης (Moco ως καταλυτικό κέντρο) και έναν τομέα που περιέχει αίμη (αίμη ως δέκτης ηλεκτρονίων). Αποτοξινώνει οξειδωτικά το τοξικό SO_3^{2-} σε μη τοξικό SO_4^{2-} , σε συνδυασμό με την επακόλουθη αναγωγή δύο ισοδυνάμων σιδηροκυτοχρώματος-c, (cyt-c)ox, στο τελικό στάδιο του καταβολισμού του θείου των αμινοξέων κυστεΐνη και μεθειονίνη [27] **(Εικόνα 12)**.



Εικόνα 12: Προτεινόμενος μηχανισμός καταλυτικής δράσης οξειδάσης θειώδους (SO) με θειώδη [27].

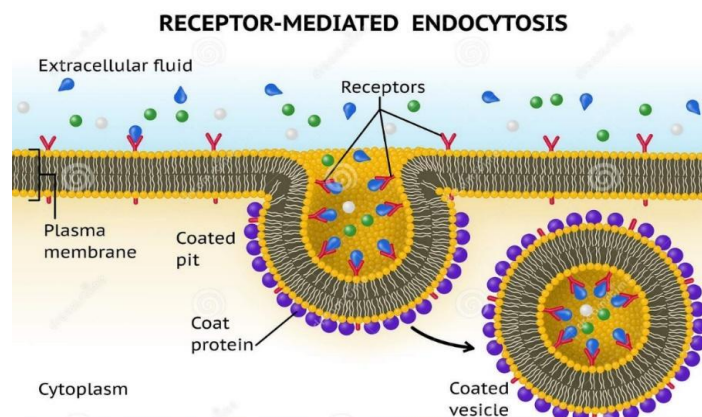
Είναι ένα βασικό ένζυμο στους οργανισμούς και η γενετική ανωμαλία που σχετίζεται με την απώλεια της SO προκαλεί νευρολογικές ανωμαλίες λόγω μειωμένης μιτοχονδριακής λειτουργίας. Η SO είναι σημαντικός παράγοντας που εμπλέκεται στην ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου, υπάρχουν όμως διαφορές στο πρότυπο έκφρασής του ανάλογα με το καρκίνωμα. Η έκφραση της SO μειώνεται σταδιακά με την εξέλιξη του όγκου στο στοματικό πλακώδες καρκίνωμα, ενώ αυξάνεται με τον πολλαπλασιασμό και την εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη και του παγκρέατος και του ήπατος [28]. Στην βιβλιογραφία αναφέρονται ανιχνευτές που ανταποκρίνονται στο συγκεκριμένο ένζυμο [29, 30].

1.3.6.2 β-γαλακτοσιδάση

Η β-γαλακτοσιδάση (β-Galactosidase, β-d-galactoside-galactohydrolase, β-gal, E.C. 3.2.1.23) καταλύει την υδρόλυση ενός γλυκοσιδικού δεσμού μεταξύ μιας τελικής μη αναγωγικής μονάδας β-D-γαλακτοσίδης και ενός τμήματος άγλυκου. Αποτελεί λυσοσωμικό υδρολυτικό ένζυμο, παίζει σημαντικό φυσιολογικό ρόλο στην κατάλυση της υδρόλυσης των γλυκοσιδικών δεσμών που μετατρέπουν τη λακτόζη σε γαλακτόζη [31]. Επιπλέον, η ανοδική ρύθμιση της β-gal συσχετίζεται συχνά με την εμφάνιση πρωτοπαθών καρκίνων των ωοθηκών και τη γήρανση των κυττάρων. Ως εκ τούτου, η ανίχνευση της δραστηριότητας της β-gal είναι σχετική με τη διάγνωση του καρκίνου [32]. Μέχρι σήμερα έχει αφιερωθεί μεγάλη προσπάθεια στην αντιμετώπιση της β-gal ως ενζυμικού στόχου με φθορίζοντες ανιχνευτές για να απεικονιστεί η δραστηριότητά της στην προκλινική διάγνωση [32-35].

1.3.7 Υπερέκφραση υποδοχέων και μεταφορέων

Ένας υποδοχέας είναι μια πρωτεΐνη που βρίσκεται είτε στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη είτε μέσα στο κυτταρόπλασμα ή στην μεμβράνη του πυρήνα του κυττάρου και συνδέεται με έναν συγκεκριμένο προσδέτη, ξεκινώντας τη μεταγωγή σήματος και μια αλλαγή στην κυτταρική δραστηριότητα. Στη θεραπευτική ανάπτυξη του καρκίνου, οι υποδοχείς μπορούν να χρησιμεύσουν όχι μόνο ως σημαντικοί διαγνωστικοί, αλλά και ως προγνωστικοί δείκτες. Δεδομένου ότι οι υποδοχείς είναι συχνά στόχοι νέας θεραπείας, η ανίχνευση των υποδοχέων μπορεί να οδηγήσει τους ερευνητές και τους ιατρούς να επιλέξουν τον σωστό πληθυσμό ασθενών που θα ωφεληθούν από τη στοχευμένη θεραπεία, ως προγνωστικό δείκτη. Στις δοκιμές «proof-of-concept», οι υποδοχείς μπορούν να λειτουργήσουν ως υποκατάστατα τελικά σημεία, επιτρέποντας την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου στόχευσης [36].



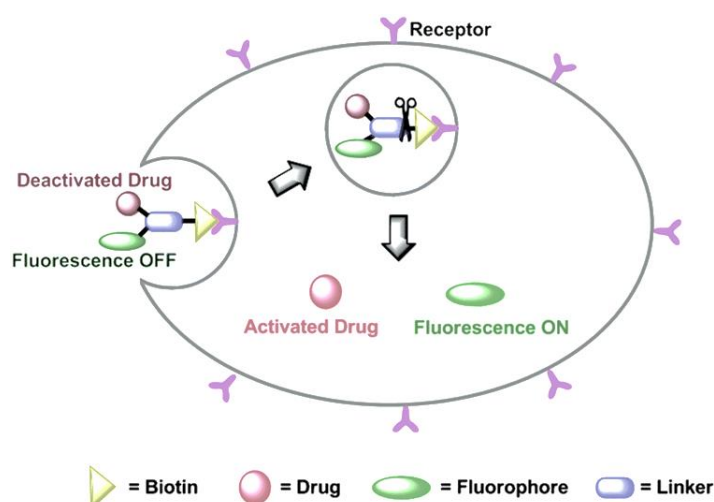
Εικόνα 13: Η ενδοκυττάρωση που προκαλείται από υποδοχείς περιλαμβάνει μεμβρανικές πρωτεΐνες που ονομάζονται υποδοχείς που δεσμεύουν συγκεκριμένα μόρια προσδέτες [37].

Κάθε κύτταρο όγκου είναι εξοπλισμένο με μια σειρά τέτοιων βιολογικά ενεργών επιφανειακών μορίων, και αρκετά από αυτά λειτουργούν ως υποδοχείς. Κάποιοι από αυτούς τους υποδοχείς υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα για να ικανοποιήσουν τις αυξημένες ανάγκες που προκύπτουν από τον υπερπολλαπλασιασμό τους ώστε τελικά να επιβιώσουν. Μία ειδική κατηγορία υποδοχέων που εστιάζουμε την προσοχή μας είναι οι υποδοχείς που προκαλούν ενδοκυττάρωση (Receptor-Mediated Endocytosis, RME). Η ενδοκυττάρωση με τη μεσολάβηση του υποδοχέα συμβαίνει όταν οι υποδοχείς στην κυτταρική διαμεμβρανική επιφάνεια δεσμεύονται από τους προσδέτες τους και ενδοκυττώνονται σε επικαλυμμένα με κλαθρίνη κοιλώματα ή κοιλότητες που γίνονται ενδοκυτταρικά κυστίδια (**Εικόνα 13**). Τελικά, αυτά τα κυστίδια χάνουν την επικάλυψη κλαθρίνης ή καβεολίνης και συγχωνεύονται με «πρώιμα ενδοσώματα», ελαφρώς όξινα κυστίδια (pH 6.0–6.5) που γίνονται «όψιμα ενδοσώματα» καθώς αυξάνεται η οξύτητά τους (pH 5.0–6.0). Τα όψιμα ενδοσώματα παραδίδουν τα μεταφερόμενα μόρια στα λυσοσώματα, όπου υφίστανται την τελική τροποποίηση και χρησιμοποιούνται από το κύτταρο για την επιβίωση του[38].

Επομένως η σύνθεση μορίων που διαθέτουν ένα στοιχείο στόχευσης, δηλαδή ένα δομικό στοιχείο που να αναγνωρίζεται ειδικά από κάποιον συγκεκριμένο υποδοχέα και να εισαγάζεται στο κύτταρο αποτελεί μια τεχνική εισαγωγής μορίων-φαρμάκων στο εσωτερικό του κυττάρου. Το στοιχείο στόχευσης αφαιρείται από τον βασικό σκελετό του μορίου κατά την επεξεργασία του στα λυσοσώματα. Αυτό πολλές φορές σημαίνει και την ενεργοποίηση του φαρμάκου.

1.3.7.1 Υποδοχέας βιοτίνης

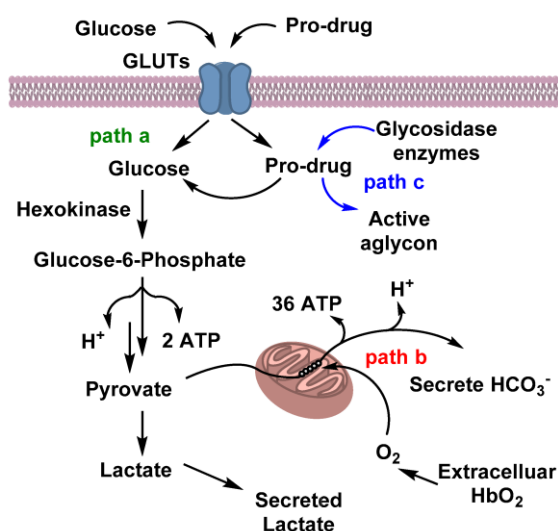
Η βιοτίνη είναι μια απαραίτητη βιταμίνη που παίζει βασικό ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό υδατανθράκων, αμινοξέων και λιπιδίων. Σε αντίθεση με τα βακτήρια, τα ευκαρυωτικά κύτταρα των θηλαστικών δεν βιοσυνθέτουν βιοτίνη και συνεπώς θα πρέπει να παραλαμβάνεται μέσω της διατροφής. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η έκφραση των υποδοχέων βιοτίνης (Biotin Receptors, BRs) συσχετίζεται με καρκίνο [39]. Μεταξύ των BR, ο εξαρτώμενος από νάτριο μεταφορέας πολυβιταμινών (Sodium-dependent MultiVitamin Transporter, SMVT) είναι απαραίτητος για την παροχή βιταμινών, όπως η βιοτίνη, στα καρκινικά κύτταρα. Επομένως, το SMVT είναι ένας δυνητικά χρήσιμος βιοδείκτης καρκίνου για τη διάγνωση όγκων (**Εικόνα 14**). Ενώ τα BR έχουν ήδη αξιοποιηθεί για ειδική στόχευση καρκινικών κυττάρων, υπάρχει έλλειψη ισχυρών ανιχνευτών απεικόνισης για BRs (ιδίως SMVT) σε καρκινικά κύτταρα και αξιολόγηση νέων στοχευμένων θεραπευτικών μέσων [40-43].



Εικόνα 14: Λογικός σχεδιαμών ανιχνευτών ή/και φαρμάκων (Fluorophore or Drug or Photosensitizer) που συνδέονται μέσω ενός συνδέτη (Linker), με μία ομάδα στόχευσης [Targeting moiety (e.g., biotin)] των καρκινικών κυττάρων [44].

1.3.7.2 Υποδοχέας γλυκόζης

Η γλυκόζη είναι πρωταρχική πηγή ενέργειας για τα περισσότερα κύτταρα και σημαντικό υπόστρωμα για πολλές βιοχημικές αντιδράσεις. Όπως η γλυκόζη είναι μια ανάγκη για κάθε κύτταρο του σώματος, έτσι είναι και οι μεταφορείς γλυκόζης. Κατά συνέπεια, όλα τα κύτταρα εκφράζουν αυτές τις σημαντικές πρωτεΐνες στην επιφάνειά τους. Τα τελευταία χρόνια, οι εξελίξεις στη γενετική έχουν ρίξει νέο φως στους τύπους και τη φυσιολογία των διαφόρων μεταφορέων γλυκόζης, από τους οποίους υπάρχουν δύο κύριοι τύποι - μεταφορείς που συνδέονται με νάτριο-γλυκόζη (Sodium-Glucose Linked Transporters, SGLTs) και μεταφορείς γλυκόζης με διευκόλυνση διάχυσης (Glucose Transporters, GLUT) - οι οποίοι μπορούν να χωριστούν σε πολλές ακόμη υποκατηγορίες. Οι SGLTs δεν χρησιμοποιούν απευθείας το ATP για τη μεταφορά της γλυκόζης. Αντίθετα, πρέπει να βασίζονται στο ποσοστό συγκέντρωσης νατρίου που δημιουργείται από την ATPάση νατρίου-καλίου ως πηγή χημικού δυναμικού. Οι GLUTs είναι ενσωματωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες με 12 διαμεμβρανικές έλικες, όπου τα 2 άκρα (N-τελικό και C-τελικό) βρίσκονται προς το κυτταρόπλασμα. Οι πρωτεΐνες GLUT μεταφέρουν τη γλυκόζη και τις σχετικές εξόζες σύμφωνα με ένα μοντέλο εναλλακτικής διαμόρφωσης, που προβλέπει ότι ο μεταφορέας εκθέτει μια μοναδική θέση δέσμησης υποστρώματος είτε προς το εξωτερικό είτε προς το εσωτερικό του κυττάρου. Η δέσμευση της γλυκόζης σε μια θέση προκαλεί μια διαμορφωτική αλλαγή που σχετίζεται με τη μεταφορά και απελευθερώνει γλυκόζη στην άλλη πλευρά της μεμβράνης [45]. Έχουν αναπτυχθεί διάφοροι ανιχνευτές, που εκμεταλλεύονται τους υποδοχείς αυτούς και μέσω υδατανθράκων που έχουν ενσωματώσει στην δομή τους μπορούν να διεισδύουν στο εσωτερικό των κυττάρων (Εικόνα 15) [46, 47].



Εικόνα 15: Μεταβολισμός γλυκόζης και μεταφορά προφαρμάκου μέσα στα κύτταρα: Η γλυκόζη ή τα γλυκο-συζευγμένα προφάρμακα εσωτερικεύονται μέσα στα κύτταρα μέσω μεταφορέων γλυκόζης (GLUTs). Ο μεταβολισμός της γλυκόζης ακολουθεί οποιαδήποτε οδό: α) αναερόβια γλυκόλυση. β) αερόβια γλυκόλυση ή γ) διάσπαση του δραστικού φαρμάκου από ένα γλυκοσιδικό ένζυμο [47].

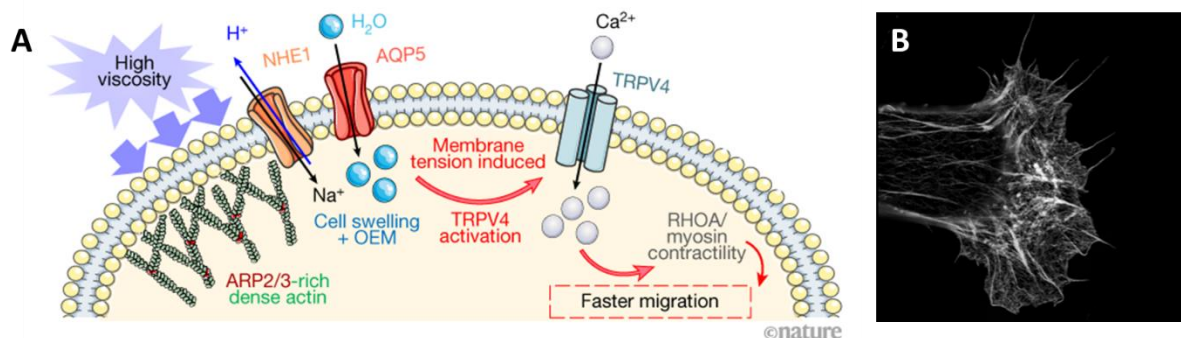
1.3.8 Αύξηση του ιξώδους

Μεταξύ των διαφόρων ιδιοτήτων των κυττάρων, το ιξώδες είναι μια θεμελιώδης φυσική παράμετρος που επηρεάζει τη διάχυση σε βιολογικές διεργασίες, όπως οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, η μεταγωγή σήματος και η μεταφορά μικρών διαλυμένων ουσιών, μακρομορίων και άλλων κυτταρικών οργανιδίων σε ζωντανά κύτταρα. Έχει αναφερθεί ότι το τοπικό μικροϊξώδες στα κύτταρα ποικίλλει από 1 έως 400 cP. Οι αλλαγές στο ενδοκυτταρικό ιξώδες σχετίζονται με διάφορες ασθένειες, όπως η αθηροσκλήρωση, η νόσος Αλτσχάιμερ και ο διαβήτης [48]. Οι μη φυσιολογικές αλλαγές στο κυτταρικό μικροϊξώδες συνδέονται επίσης στενά με κακοήθεις όγκους. Τα μιτοχόνδρια, ως «σταθμοί ενέργειας των κυττάρων», εμπλέκονται στη ρύθμιση διαφόρων

κυτταρικών λειτουργιών. Πρόσφατες έρευνες αποκάλυψαν ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μπορεί να προκαλέσει αλλαγή του ενδοκυτταρικού ιώδους, και το ιώδες της μιτοχονδριακής μήτρας των καρκινικών κυττάρων είναι υψηλότερο από αυτό των φυσιολογικών κυττάρων [49]. Έτσι, η παρακολούθηση του μιτοχονδριακού ιώδους είναι σημαντική για τη διάγνωση του καρκίνου.

Τα κύτταρα του σώματός μας εκτίθενται συνεχώς σε υγρά διαφορετικού ιώδους. Τι προκαλεί όπως αυτή την αλλαγή στο ιώδες των καρκινικών κυττάρων; Σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις όπως η ανάπτυξη όγκου, το τοπικό ιώδες που περιβάλλει τον αρχικό όγκο αυξάνεται λόγω μη φυσιολογικής αποικοδόμησης πρωτεϊνών [50]. Επίσης, η ανάγκη για αγγείωση οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή αιμοπεταλίων και λεμφοκυττάρων, που αποτελούν μέρος του μικροπεριβαλλοντικού ιώδους. Επιπλέον, η περίσσεια γαλακτικού οξέος που παράγεται σε καρκινικούς όγκους και τα υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών, ενζύμων και λιπιδίων που απαιτούνται για τους όγκους μπορούν επίσης να συμβάλλουν στο μικροπεριβαλλοντικό ιώδες. Επιπρόσθετα, οι αλλαγές των εξωκυτταρικών εκκρίσεων και των συστατικών της εξωκυτταρικής μήτρας που προκαλούνται από τον μοναδικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων επηρεάζουν επίσης τις διακυμάνσεις του ιώδους στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Κατά συνέπεια, η υπερέκφραση των προαναφερθέντων δεικτών συμμετέχει στην αύξηση του ιώδους στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Έτσι, το ιώδες θα μπορούσε εύλογα να θεωρηθεί ως βιοδείκτης για τη διάγνωση του καρκίνου. [51].

Η μετάσταση, κατά την οποία τα καρκινικά κύτταρα διαχωρίζονται από τον κύριο όγκο και εξαπλώνονται σε όλο το σώμα για να εισβάλουν σε άλλους ιστούς, είναι ένα κρίσιμο στάδιο στην ανάπτυξη της νόσου. Σε περιβάλλοντα υψηλού ιώδους, τα κύτταρα τροποποιούν την κυτταρική τους αρχιτεκτονική προκειμένου να αντέχουν καλύτερα τις περιβαλλοντικές πιέσεις και να μεταναστεύουν. Σε περιορισμένα σημεία, τα καρκινικά κύτταρα κινούνται απορροφώντας νερό στη μια πλευρά του κυττάρου και εκτοξεύοντάς το από την άλλη πλευρά οδηγώντας έτσι στην προώθησή τους. Ακόμη και όταν επαναφέρονται σε υγρό μέσο, συνεχίζουν να ταξιδεύουν γρήγορα, υποδηλώνοντας ότι μπορεί να διατηρήσουν μια μνήμη ιώδους [52, 53]. Πιο συγκεκριμένα, η πρόσθετη μηχανική δύναμη που επιβάλλεται στα κύτταρα από το παχύρρευστο υγρό προκαλεί φόρτωση ενός ενδοκυτταρικού δικτύου δομών νημάτων που αποτελείται από μια πρωτεΐνη που ονομάζεται ακτίνη. Σε απόκριση, τα νημάτια ακτίνης στη μεμβράνη του κυττάρου γίνονται πιο πυκνά. Επιπλέον, μια πρωτεΐνη μεμβράνης που ονομάζεται αντλία Na^+/H^+ 1 (Na^+/H^+ Exchanger 1, NHE1), λειτουργεί μαζί με κανάλια νερού για να διευκολύνει την πρόσληψη του. Έτσι, συγκεντρώνεται περισσότερο νερό στην πρόσθια άκρη του κυττάρου από ότι συνήθως. Ταυτόχρονα λαμβάνει χώρα ενεργοποίηση μηχανικά ευαίσθητων καναλιών ιόντων στη μεμβράνη που ονομάζονται κανάλια TRPV4. Τα ενεργοποιημένα κανάλια TRPV4 μεταφέρουν ιόντα ασβεστίου στο κύτταρο, προάγοντας τελικά την ικανότητα του κυττάρου να συστέλλεται. Το πυκνότερο δίκτυο ακτίνης στο κύτταρο και η αυξημένη συσταλτικότητα δημιουργούν ισχυρότερες δυνάμεις για να ξεπεραστούν οι αυξημένες δυνάμεις ιώδους, ενισχύοντας έτσι την ταχύτητα της μετανάστευσης των κυττάρων.



Εικόνα 16: Α) Η οδός ανίχνευσης ιώδους, Β) Τα νημάτια ακτίνης συσσωρεύονται στο μπροστινό μέρος ενός καρκινικού κυττάρου του μαστού που μεταναστεύει σε ένα μέσο υψηλού ιώδους [52].

Τα τελευταία χρόνια, η ανίχνευση ιζώδους γίνεται κυρίως με τη χρήση μοριακών ρότορων φθορισμού (Fluorescent Molecular Rotors, FMR). Ο όρος «μοριακοί ρότορες φθορισμού» αναφέρεται σε μικρά συνθετικά φθοροφόρα στα οποία η εκπομπή φθορισμού είναι ευαίσθητη σε ιζώδη περιβάλλοντα. Αυτό επιτυγχάνεται τυπικά μέσω της αλλαγής του ρυθμού μη ακτινοβολούσας αποδιέγερσης σε ένα ιζώδες περιβάλλον. Η αλλαγή στο σήμα φθορισμού συνήθως προκύπτει από τον ανταγωνισμό μεταξύ του φθορισμού και της ενδομοριακής περιστροφής, η οποία αλλάζει τη φύση της ηλεκτρονικά διεγερμένης κατάστασης που είναι υπεύθυνη για την εκπομπή φωτονίων. Μέχρι σήμερα, η πιο συχνά αναφερόμενη κατηγορία μοριακών ρότορων είναι αυτοί με διεγερμένες καταστάσεις Συστραμμένης Ενδομοριακής Μεταφοράς Φορτίου (Twisted Intramolecular Charge Transfer, TICT). Πιο πρόσφατα, εμφανίστηκαν οι μοριακοί ρότορες ICT με πιο εκτεταμένα συζυγιακά συστήματα [54]. Ένα κοινό χαρακτηριστικό του FMR είναι ότι αποτελείται από δύο τμήματα, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με έναν απλό δεσμό. Ένα τμήμα με μεγάλη ροπή αδράνειας που παραμένει σταθερό, και ένα δεύτερο τμήμα με μικρότερη ροπή αδράνειας που περιστρέφεται. Σε ένα μέσο χαμηλού ιζώδους, ο ρότορας περιστρέφεται ελεύθερα και η ενέργεια αποδιέγερσης διαχέεται με μη ακτινοβολούμενο τρόπο. Ωστόσο, σε ένα μέσο υψηλού ιζώδους, η περιστροφή μέσω του δεσμού C-C περιορίζεται και η ενέργεια διέγερσης απελευθερώνεται ως εκπομπή με ενισχυμένη ένταση φθορισμού και διάρκεια ζωής. Επομένως, ο φυσικός μηχανισμός της εξάρτησης από το ιζώδες της κβαντικής απόδοσης φθορισμού και της διάρκειας ημιζωής προκαλείται από τη στερική παρεμπόδιση της ενδομοριακής περιστροφής [55]. Η συσχέτιση μεταξύ της έντασης του φθορισμού και/ή της διάρκειας ημιζωής του φθορισμού και του ιζώδους του διαλύτη τα καθιστά κατάλληλους ανιχνευτές για την απεικόνιση του ιζώδους σε ζωντανά κύτταρα μέσω αποκρίσεων με βάση την ένταση ή απεικόνισης φθορισμού καθ' όλη τη διάρκεια ζωής. Προσθέτοντας μια ειδική για τα οργανίδια ομάδα, οι μοριακοί περιστρεφόμενοι ανιχνευτές μπορούν να εξετάσουν το ιζώδες στις μεμβράνες, τα λυσοσώματα και τα μιτοχόνδρια [55-58].

1.3.9 Μείωση της πολικότητας

Όπως το ιζώδες, έτσι και η πολικότητα αποτελεί μια βασική παράμετρο που επηρεάζει σημαντικά μια σειρά από οργανικές και ανόργανες διεργασίες. Στα βιολογικά συστήματα, η πολικότητα επηρεάζει την αλληλεπίδραση εκτεταμένων πρωτεϊνών και ενζύμων και τη σταθερότητα της λιπιδικής μεμβράνης. Μια βασική λειτουργία της πολικότητας των κυττάρων είναι να οργανώνει χωρικά τα μονοπάτια σηματοδότησης μέσα στα κύτταρα. Αυτό παρέχει έναν σημαντικό μηχανισμό στα κύτταρα. Να αναγνωρίζουν και να ενσωματώνουν στοιχεία από το περιβάλλον τους για τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, του μεταβολισμού, της διαφοροποίησης και της κινητικότητας. Κατά κύριο λόγο, η πολικότητα ρυθμίζεται μέσω πρωτεϊνών που οργανώνονται σε συμπλέγματα (π.χ., σύμπλεγμα Crumbs) και αλληλεπιδρούν με άλλες βασικές πρωτεΐνες στην διαμεμβρανική περιοχή. Μη φυσιολογικές μεταβολές στην πολικότητα συνδέονται στενά με διαταραχές και ασθένειες που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των κυττάρων όπως οι φλεγμονές, η παχυσαρκία, η γήρανση και ο καρκίνος [59].

Επιπλέον, λόγω της σημαντικής διαφοράς πολικότητας των κυτταρικών οργανιδίων, είναι απαραίτητο να ελεγχθεί η πολικότητα συγκεκριμένου οργανιδίου. Ως τα κύρια πεπτικά οργανίδια στα κύτταρα, τα λυσοσώματα λαμβάνουν μακρομόρια από διάφορες οδούς διακίνησης μεμβρανών και τα αποικοδομούν με μια σειρά όξινων υδρολασών, η οποία είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων και την αποτελεσματική προστασία των κυττάρων από μόλυνση, ασιτία και στρες. Η λυσοσωμική πολικότητα επηρεάζει σημαντικά τη ρευστότητα της μεμβράνης και τις ενζυμικές αντιδράσεις στα λυσοσώματα και θεωρείται βασικός δείκτης της λυσοσωμικής λειτουργίας. Η αλλαγή της λυσοσωμικής πολικότητας μπορεί να αντανάκλα τη διακύμανση των κυτταρικών καταστάσεων που προκαλούνται από σχετικές φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες. Για παράδειγμα, ο καρκίνος, η φλεγμονή και το λιπώδες ήπαρ μειώνουν τη λυσοσωμική

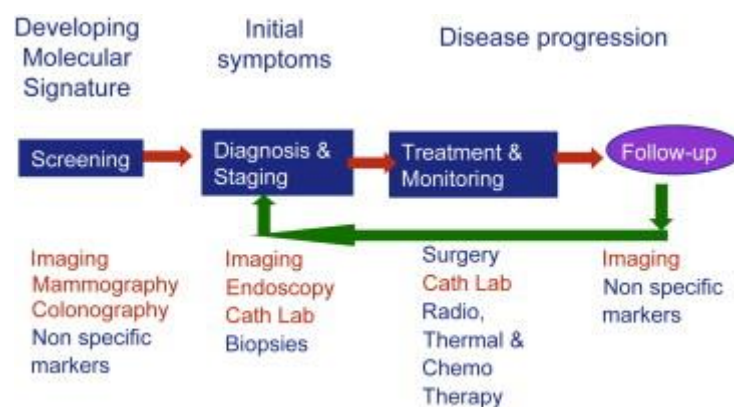
πολικότητα και η πολικότητα των λυσοσωμάτων αυξάνεται με τη γήρανση των κυττάρων. Η παρακολούθηση της λυσοσωμικής πολικότητας μπορεί να δώσει μια εικόνα για τις σχετικές φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες και να αναπτύξει νέες διαγνωστικές μεθόδους. Ωστόσο, η πολικότητα είναι ένας πολύπλοκος παράγοντας και καλύπτει μια σειρά από μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, συμπεριλαμβανομένης της διπόλου-διπόλου και δεσμών υδρογόνου, επομένως η παρακολούθηση της λυσοσωμικής πολικότητας σε πραγματικό χρόνο παραμένει πρόκληση. Ως εκ τούτου, είναι ένα σημαντικό να αναπτυχθούν νέα εργαλεία για την ανίχνευση της λυσοσωμικής πολικότητας σε ζωντανά κύτταρα [60-64].

1.3.10 Ανταπόκριση σε μεταβολές της θερμοκρασίας

Τελευταίος αλλά εξίσου σημαντικός παράγοντας ανίχνευσης παθογένειας-μεταξύ άλλων και του καρκίνου- είναι η αλλαγή φθορισμού με τη θερμοκρασία. Σε οποιοδήποτε σύστημα συμπεριλαμβανομένου του κυττάρου, η μέτρηση της θερμοκρασίας είναι μια από τις θεμελιώδεις μετρήσεις της ενέργειας, και συνήθως σχετίζεται με παθογένειες ή τουλάχιστον με αλλαγές στις οδούς κατανάλωσης και παραγωγής ενέργειας. Καθορίζει πολλές βιολογικές διεργασίες και τα περισσότερα κυτταρικά συμβάντα, όπως ενζυμικές αντιδράσεις που εκτελούνται σε κάποια βέλτιστη θερμοκρασία. Έτσι έχουν αναπτυχθεί ανιχνευτές φθορισμού που σε μεταβολή της θερμοκρασίας παρουσιάζουν αλλαγές στην ένταση ή την αναλογία εκπομπής, στα μέγιστα εκπομπής ή/και στη διάρκεια ζωής του φθορισμού. Ανιχνευτές που ανταποκρίνονται σε μεταβολές του ιξώδους συχνά συνδέονται και με ανταπόκριση στην μεταβολή της θερμοκρασίας. Είναι γνωστό ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία μειώνεται το ιξώδες οπότε αναμένεται και μείωση του φθορισμού με αύξηση της θερμοκρασίας. Το γεγονός αυτό είναι λογικό αφού αύξηση της θερμοκρασίας συνεπάγεται μεγαλύτερη προσφορά ενέργειας στο σύστημα άρα και πιο έντονη περιστροφή του μορίου με συνέπεια την σβέση του φθορισμού. Ένας ανιχνευτής όπου με μικρή μεταβολή της θερμοκρασίας (π.χ., από τους 37 °C στους 40 °C) παρουσιάζει έντονη μεταβολή στην ένταση του φθορισμού μπορεί να αποδειχθεί εξαιρετικό εργαλείο ως θερμομετρητής [64, 65].

1.4 Διάγνωση του καρκίνου

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως ο καρκίνος είναι μια σύνθετη ασθένεια παγκόσμιας ανησυχίας. Μαζί με τη βελτίωση των αποτελεσμάτων, η έγκαιρη και ευαίσθητη ανίχνευση καρκίνου και καρκινικών βιοδεικτών μπορεί να διευκολύνει την κατανόηση της εξέλιξης του καρκίνου και να βοηθήσει στην ανάπτυξη αποτελεσματικών μεθόδων θεραπείας (**Εικόνα 17**). Οι πιο συχνές τεχνικές ανίχνευσης καρκίνου είναι οι εργαστηριακές δοκιμές, η βιοψία και οι δοκιμές απεικόνισης [66].



Εικόνα 17: Ο τρέχων ρόλος της απεικόνισης στην αντιμετώπιση του καρκίνου [67].

1.4.1 Εργαστηριακά δοκίμια

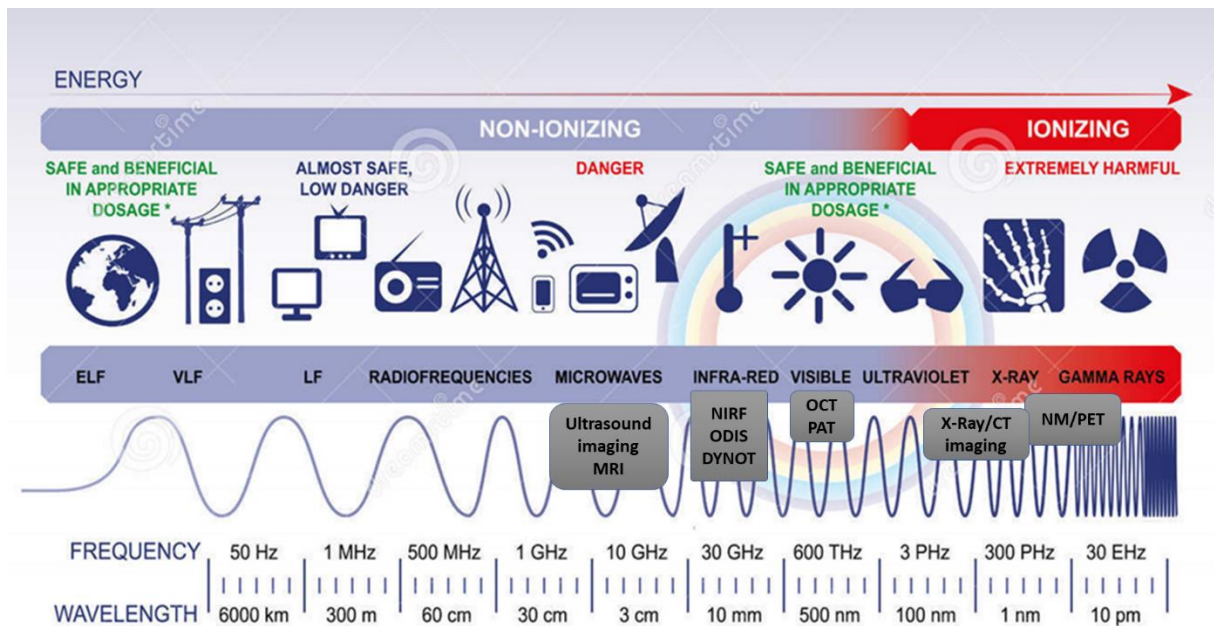
Υψηλά ή χαμηλά επίπεδα ορισμένων ουσιών στο σώμα μπορεί να αποτελούν ένδειξη καρκίνου. Έτσι, οι εργαστηριακές εξετάσεις του αίματος, των ούρων ή άλλων σωματικών υγρών που μετρούν αυτές τις ουσίες μπορούν να βοηθήσουν τους γιατρούς να κάνουν διάγνωση. Ωστόσο, τα μη φυσιολογικά εργαστηριακά αποτελέσματα δεν αποτελούν σίγουρο σημάδι καρκίνου.

1.4.2 Βιοψία

Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι γιατροί πρέπει να κάνουν βιοψία για τη διάγνωση του καρκίνου. Η βιοψία είναι μια διαδικασία στην οποία ο γιατρός αφαιρεί ένα δείγμα ιστού. Αυτό εξετάζεται κάτω από ένα μικροσκόπιο και υπόκειται σε άλλες εξετάσεις για να διαπιστωθεί εάν ο ιστός είναι καρκίνος. Μπορεί να γίνει μέσω βελόνας ή μέσω ενδοσκοπικής (π.χ., κολονοσκόπηση, βρογχοσκόπηση), ή με χειρουργική επέμβαση.

1.4.3 Τεχνικές απεικόνισης

Η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη είναι η βασική αρχή που καθιστά δυνατή την οπτικοποίηση των ιστών και των κυττάρων. Οι σχετικές συχνότητες της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας φαίνονται στην **Εικόνα 18**.



Εικόνα 18: Φάσμα συχνοτήτων τεχνολογιών απεικόνισης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας [67, 68].

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία υψηλής συχνότητας που χρησιμοποιεί ακτίνες γάμμα, ακτίνες X ή υπεριώδες φως είναι ιονίζουσα και μπορεί να προκαλέσει βλάβη στον ανθρώπινο οργανισμό και πιθανά σε καρκίνο. Οι εκτιμήσεις δοσολογίας διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη χρήση της απεικόνισης που βασίζεται στην ιονίζουσα ακτινοβολία. Ωστόσο, υπάρχουν και τεχνικές απεικόνισης μη ιονίζουσας ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας όπως η φασματοσκοπία εγγύς υπέρυθρης ακτινοβολίας και η τομογραφία, η φασματοσκοπία απεικόνισης μικροκυμάτων και η φωτοακουστική και θερμοακουστική απεικόνιση.

1.4.3.1 Η αξονική τομογραφία - Computed Tomography- CT Scan

Μια αξονική τομογραφία χρησιμοποιεί μια μηχανή ακτίνων X που είναι συνδεδεμένη με έναν υπολογιστή για να τραβήξει μια σειρά από εικόνες των οργάνων από διαφορετικές οπτικές γωνίες.

Αυτές οι εικόνες χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία λεπτομερών τρισδιάστατων εικόνων του εσωτερικού του σώματος. Μερικές φορές, ενδέχεται να συνδυάζεται με κάποιο ιχνηθέτη πριν τη σάρωση που διευκολύνει την ανάγνωση των εικόνων επισημαίνοντας ορισμένες περιοχές του σώματος.

1.4.3.2 Μαγνητική τομογραφία - Magnetic Resonance Imaging- MRI

Η μαγνητική τομογραφία χρησιμοποιεί έναν ισχυρό μαγνήτη και ραδιοκύματα για να καταγράψει φωτογραφίες του σώματός σε τομές. Αυτές οι τομές χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία λεπτομερών εικόνων του εσωτερικού του σώματός, οι οποίες μπορούν να δείξουν τη διαφορά μεταξύ υγιούς και μη υγιούς ιστού. Και αυτή η μέθοδος μπορεί να συνδυάζεται με κάποιον ιχνηθέτη.

Το MRS είναι μια τεχνική MRI που μετρά τις αλλαγές στη διέγερση / εκπομπή πρωτονίων / πυρήνων που σχετίζονται με διάφορους μεταβολίτες, όπως μεταξύ άλλων η χολίνη, το πυροσταφυλικό, το γαλακτικό, τα λιπίδια και οι πολυαμίνες .

1.4.3.3 Πυρηνική σάρωση - Nuclear Scan

Η πυρηνική σάρωση χρησιμοποιεί ραδιενεργό υλικό για τη λήψη φωτογραφιών από το εσωτερικό του σώματος. Αυτός ο τύπος σάρωσης μπορεί επίσης να ονομαστεί ραδιονουκλιδική σάρωση. Πριν από αυτήν τη σάρωση, λαμβάνεται μια ένεση μικρής ποσότητας ραδιενεργού υλικού, το οποίο μερικές φορές ονομάζεται ιχνηθέτης. Ρέει μέσω της κυκλοφορίας του αίματός σας και συλλέγεται σε ορισμένα οστά ή όργανα. Η σάρωση γίνεται με ένα μηχάνημα που ονομάζεται σαρωτής που ανιχνεύει και μετρά τη ραδιενέργεια στο σώμα, δημιουργώντας εικόνες οστών ή οργάνων σε οθόνη υπολογιστή ή σε ταινία. Μετά τη σάρωση, το ραδιενεργό υλικό στο σώμα θα χάσει την ραδιενέργεια του με την πάροδο του χρόνου ή μπορεί επίσης να αφήσει το σώμα μέσω των ούρων ή των κοπράνων.

1.4.3.4 Σάρωση οστών - Bone Scan

Οι ανιχνεύσεις οστών είναι ένας τύπος πυρηνικής σάρωσης που ελέγχει για μη φυσιολογικές περιοχές ή βλάβη στα οστά. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση του καρκίνου των οστών ή του καρκίνου που έχει εξαπλωθεί στα οστά (ονομάζονται επίσης μεταστατικοί όγκοι των οστών).

1.4.3.5 Σάρωση PET - PET Scan

Η σάρωση PET είναι ένας τύπος πυρηνικής σάρωσης που κάνει λεπτομερείς τρισδιάστατες εικόνες περιοχών μέσα στο σώμα όπου σαν δείκτης λαμβάνεται ιχνηθετιμένη με ^{18}F γλυκόζη, καθώς τα καρκινικά κύτταρα καταναλώνουν περισσότερη γλυκόζη από τα υγιή κύτταρα. Πριν από τη σάρωση, λαμβάνεται σε ενέσιμη μορφή ο ιχνηθέτης γλυκόζη ^{18}F -FDG.

1.4.3.6 Υπέρηχος – Ultrasound (US)

Μια εξέταση υπερήχων χρησιμοποιεί ηχητικά κύματα υψηλής ενέργειας. Τα ηχητικά κύματα αντηχούν στους ιστούς μέσα στο σώμα. Ένας υπολογιστής χρησιμοποιεί αυτούς τους ήχους που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση με τους ιστούς για να δημιουργήσει εικόνες από περιοχές μέσα στο σώμα. Αυτή η εικόνα ονομάζεται υπερηχογράφημα.

1.4.3.7 Ακτινογραφίες - X-rays

Οι ακτίνες X χρησιμοποιούν χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας για να δημιουργήσουν εικόνες του σώματος. Βέβαια τις τελευταίες δεκαετίες έχουν βρεθεί πιο εξειδικευμένοι μέθοδοι ανίχνευσης καρκινικών κυττάρων με πάρα πολλά πλεονεκτήματα όπως η γρήγορη ανίχνευση ακόμα και σε πρώιμα στάδια της νεοπλασίας, η μη απαίτηση χειρουργικών επεμβάσεων-μη επεμβατικές τεχνικές, έχουν υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία και ταυτόχρονα προσφέρουν ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο.

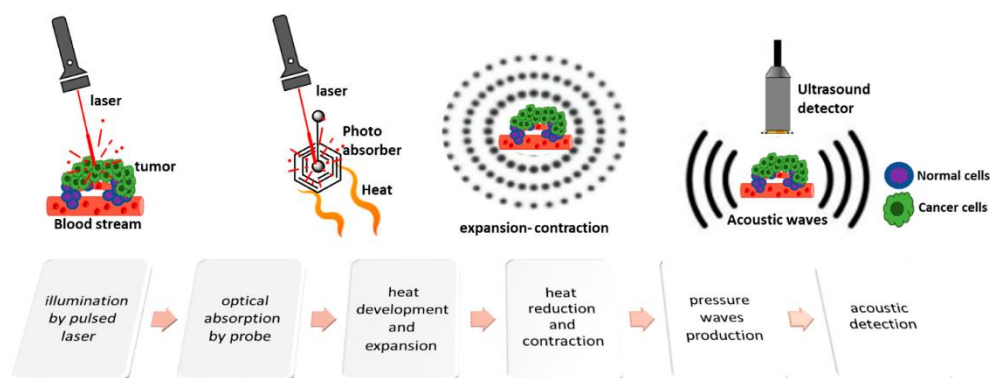
1.5 Οπτική μοριακή απεικόνιση

1.5.1 Φωτοακουστική απεικόνιση (Photoacoustic Imaging - PAI)

Η φωτοακουστική απεικόνιση είναι μια υβριδική μη ιονίζουσα τεχνική που βασίζεται στο φωτοακουστικό φαινόμενο και αναφέρεται στην αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (η οποία περιλαμβάνει οπτικά κύματα, κύματα ραδιοσυχνοτήτων και μικροκύματα) με τον ιστό προκειμένου να δημιουργήσει ακουστικά κύματα. Έτσι, ένα λέιζερ παλμού νανοδευτερόλεπτη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ακτινοβολία ενός βιολογικού ιστού (οπτική διέγερση) και στη συνέχεια ένας μετατροπέας συστολίας υπερήχων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του σήματος (ανίχνευση υπερήχων) [69].

Οι διεργασίες που συμβαίνουν μέσα στον ιστό και οδηγούν στο σήμα εξόδου μπορούν να περιγραφούν σε μερικά βήματα:

1. Ένα λέιζερ βραχέων παλμών, ως πηγή ενέργειας, μεταφέρει φωτόνια σε έναν ιστό στόχο.
2. Η ενέργεια των φωτονίων απορροφάται από ενδογενείς ή εξωγενείς παράγοντες αντίθεσης με οπτικές ιδιότητες που προκαλούν ενεργοποίηση.
3. Η απορροφούμενη οπτική ενέργεια μετατρέπεται εν μέρει ή πλήρως σε θερμότητα.
4. Ο θερμοελαστικός ιστός θερμαίνεται και διαστέλλεται.
5. Η θερμότητα μεταφέρεται σε ψυχρότερες περιοχές και ο ιστός συσπάται.
6. Η διαστολή και η συστολή του ιστού προκαλούν παλμικές αλλαγές πίεσης.
7. Αυτές, με τη σειρά τους, οδηγούν στην παραγωγή κυμάτων ακουστικής πίεσης.
8. Τα ευρυζωνικά ακουστικά κύματα ανιχνεύονται από έναν μετατροπέα υπερήχων και υποβάλλονται σε επεξεργασία για τη δημιουργία εικόνας (**Εικόνα 19**)



Εικόνα 19: Σχηματική αναπαράσταση των βασικών αρχών της φωτοακουστικής απεικόνισης. Ο καρκινικός ιστός (πράσινα κύτταρα) ακτινοβολείται με παλμική ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, η οποία απορροφάται από έναν φωτοευαίσθητοποιητή, για να παράγει ηχητικά κύματα που ανιχνεύονται από έναν εστιασμένο υπερηχητικό μετατροπέα [69].

1.5.2 Απεικόνιση με ανιχνευτές βασισμένους σε νανοϋλικά

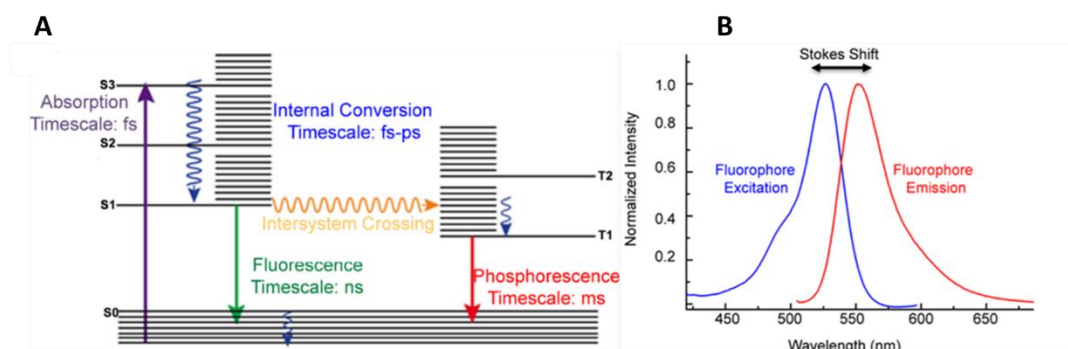
Ορισμένοι ανιχνευτές νανোসωματιδίων διαθέτουν αρκετές μοναδικές ιδιότητες που είναι πλεονεκτικές για χρήση στην ανίχνευση καρκίνου στα αρχικά στάδια. Η τεχνική αυτή μπορεί να επιτρέψει την έγκαιρη ανίχνευση καρκίνου και θα μπορούσε να επεκτείνει την επιβίωση των ασθενών μέσω της ικανότητας χορήγησης θεραπευτικής αγωγής στα πρώτα στάδια της νόσου. Οι οπτικές ιδιότητες των ημιαγωγών και των μεταλλικών νανোসωματιδίων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το μέγεθος, το σχήμα και τη σύνθεση των νανোসωματιδίων. Συγκεκριμένα, οι οπτικές ιδιότητες που σχετίζονται περισσότερο με το σχεδιασμό βιοαισθητήρων με βάση τον φθορισμό για τη διάγνωση καρκίνου, την ένταση και τη σταθερότητα των εκπομπών φθορισμού καθώς και την αποτελεσματικότητα της απόσβεσης φθορισμού σε «off-on» ανιχνευτές, καθορίζουν, εν μέρει, την ευαισθησία και δυναμικό εύρος μιας συγκεκριμένης ανάλυσης. Τέτοιοι ανιχνευτές μεταφέρονται στα

καρκινικά κύτταρα μέσω παθητικής μεταφοράς, εκμεταλλευόμενοι το φαινόμενο EPR (Enhanced Permeability and Retention). Το φαινόμενο αυτό επιτρέπει σε μόρια τέτοιου μεγέθους να συσσωρεύονται στην περιοχή του όγκου λόγω της κακής αρχιτεκτονικής των ενδοθηλιακών κυττάρων του όγκου [70].

1.5.3 Απεικόνιση φωταύγειας- φθορισμού και φωσφορισμού

Η φωταύγεια είναι η εκπομπή φωτός από οποιαδήποτε ουσία και εμφανίζεται κατά την αποδιέγερση ηλεκτρονικά διεγερμένων καταστάσεων. Η φωταύγεια χωρίζεται σε δύο κατηγορίες – τον φθορισμό και τον φωσφορισμό - ανάλογα με τη φύση της διεγερμένης κατάστασης.

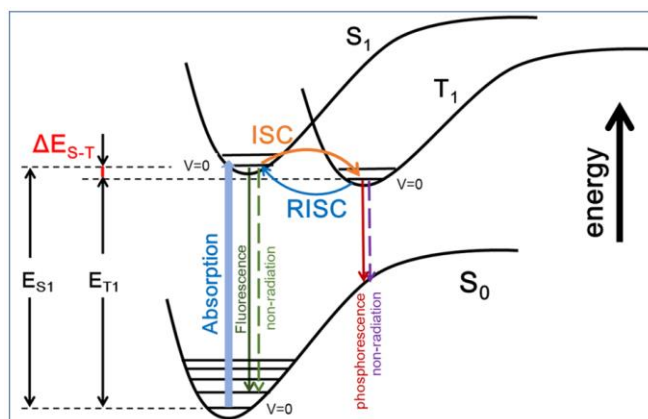
Ο φθορισμός είναι ένας από τους πιο δημοφιλείς μεταξύ των υφιστάμενων τεχνικών βιοαπεικόνισης, επειδή επιτρέπει τη διερεύνηση βιολογικών δειγμάτων απευθείας *in situ* και παρέχει πλούσιες πληροφορίες σε βιομοριακό επίπεδο. Χρησιμοποιείται ευρέως σε βιολογικές και βιοϊατρικές εφαρμογές λόγω της υψηλής χωροχρονικής ανάλυσής της, της ευαισθησίας και της μη επεμβατικότητας της αφού χρησιμοποιεί μη ιονίζουσα ακτινοβολία. Αποτελεί ένα οπτικό φαινόμενο όπου η απορρόφηση των φωτονίων σε ένα μήκος κύματος οδηγεί σε εκπομπή σε ένα άλλο, συνήθως μεγαλύτερο, μήκος κύματος. Η απώλεια ενέργειας μεταξύ των απορροφούμενων και των εκπεμπόμενων φωτονίων είναι το αποτέλεσμα της δονητικής χαλάρωσης, και αυτή η διαφορά αναφέρεται ως μετατόπιση Stokes (Stokes Shift). Ένα τυπικό διάγραμμα Jablonski μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει τη διαδικασία φθορισμού (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: A: Διάγραμμα Jablonski που περιλαμβάνει τυπικές χρονικές κλίμακες φωτοφυσικών διεργασιών για οργανικά μόρια. B: Μοριακό φάσμα φθορισμού που απεικονίζει τη διεύρυνση των φασματικών γραμμών λόγω της παρουσίας των δονητικών επιπέδων ενέργειας και της μετατόπισης Stokes μεταξύ των μεγεθών διέγερσης και εκπομπής [70].

Στην πρώτη φάση, γνωστή ως διέγερση, η απορρόφηση του φωτός οδηγεί στην ώθηση ενός ηλεκτρονίου από την θεμελιώδη, S₀, κατάσταση συνήθως στην πρώτη διεγερμένη κατάσταση, S₁. Μόλις διεγερθεί, η απελευθέρωση της απορροφούμενης ενέργειας μπορεί να συμβεί μέσω αρκετών φωτοφυσικών γεγονότων, συμπεριλαμβανομένων τόσο της ακτινοβολίας όσο και της μη ακτινοβολούμενης εκπομπής. Η δονητική χαλάρωση είναι συχνά η πρώτη οδός για την απαγωγή ενέργειας και μπορεί να ακολουθείται από εσωτερική μετατροπή (Internal conversion), διέλευση μεταξύ συστημάτων (από μια απλή σε τριπλή κατάσταση, Intersystem crossing) και επακόλουθο φθορισμό ή φωσφορισμό όταν το διεγερμένο ηλεκτρόνιο επιστρέφει στην θεμελιώδη κατάσταση εκπέμποντας ενέργεια μέσω την απελευθέρωση ενός φωτονίου-χαμηλότερης ενέργειας από το φωτόνιο διέγερσης. Τυπικά εμφανίζεται σε αρωματικά συστήματα., και τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής φθορισμού είναι συμμετρικής φύσεως αφού οι δονητικές καταστάσεις τόσο της θεμελιώδους όσο και της πρώτης διεγερμένης κατάστασης είναι ενεργειακά παρόμοιες. Οι διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα γίνονται σε χρόνους περίπου 10⁻¹⁵ δευτερόλεπτα, πολύ μικρούς για να συμβούν σημαντικές αλλαγές στον πυρήνα, όπως ανέφερε χαρακτηριστικά ο Franck Condon.

Σε διεγερμένες απλές καταστάσεις, το ηλεκτρόνιο στο διεγερμένο τροχιακό διαθέτει αντίθετο spin (ιδιοπεριστροφή) από εκείνο το ηλεκτρόνιο στο τροχιακό της θεμελιώδους κατάστασης. Κατά συνέπεια, η επιστροφή στη θεμελιώδη κατάσταση είναι επιτρεπτή για το spin και συμβαίνει γρήγορα με την εκπομπή ενός φωτονίου. Οι ρυθμοί εκπομπής του φθορισμού είναι συνήθως 10^{-8} sec (**Εικόνα 21**) [71].



Εικόνα 21: Διάγραμμα Jablonski μιας αντιπροσωπευτικής ενεργοποιημένης διαδικασίας φθορισμού. Το ISC υποδηλώνει τη διασυστημική διασταύρωση και το RISC είναι η αντίστροφη διασυστημική διασταύρωση. Τα S_1 και T_1 αντιπροσωπεύουν τις χαμηλότερες διεγερμένες καταστάσεις μονής και τριπλής, αντίστοιχα [72].

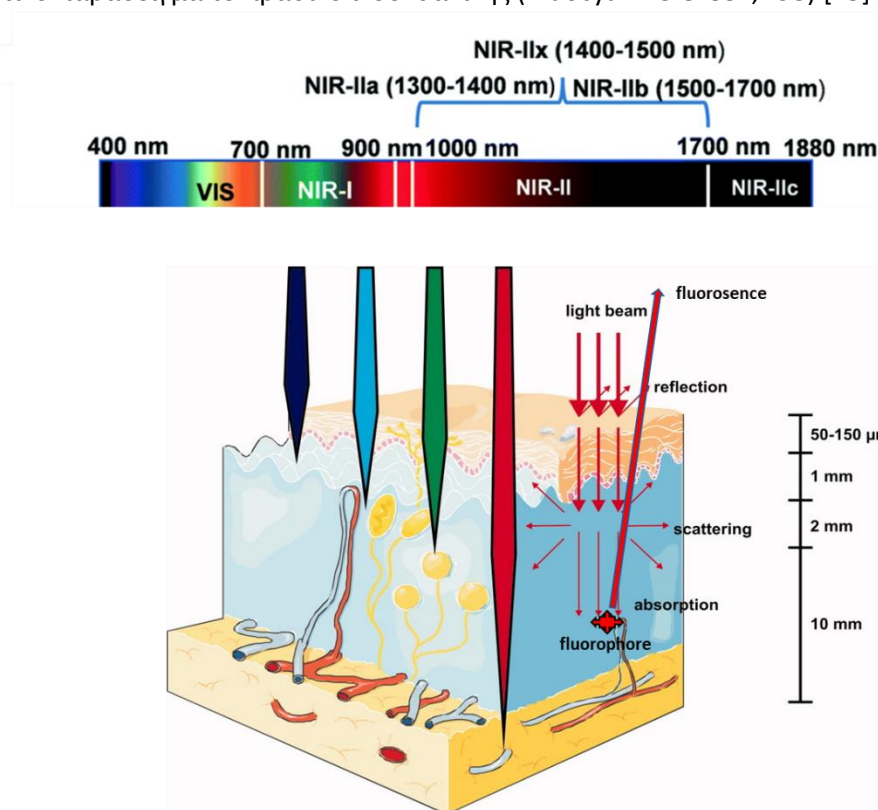
Ο φωσφορισμός είναι η εκπομπή φωτός από τριπλά διεγερμένες καταστάσεις, στις οποίες το ηλεκτρόνιο στο διεγερμένο τροχιακό έχει τον ίδιο προσανατολισμό spin με το ηλεκτρόνιο θεμελιώδους κατάστασης. Οι μεταβάσεις στη βασική κατάσταση είναι απαγορευμένες και οι ρυθμοί εκπομπής είναι αργοί (10^{-3} έως 10^0 sec), έτσι ώστε οι χρόνοι ζωής φωσφορισμού να είναι συνήθως χιλιοστά του δευτερολέπτου έως δευτερόλεπτα. Τα μόρια που περιέχουν βαρέα άτομα όπως το βρώμιο και το ιώδιο είναι συχνά φωσφορίζοντα. Τα βαρέα άτομα διευκολύνουν τη διασυστημική διασταύρωση και έτσι ενισχύουν τις κβαντικές αποδόσεις φωσφορισμού [72].

1.6 Απεικόνιση φθορισμού στην περιοχή τους εγγύς υπέρυθρου (Near Infrared, NIR)

Οι προσεγγίσεις οπτικής απεικόνισης αναδεικνύονται ως πολλά υποσχόμενες μη επεμβατικές, σε πραγματικό χρόνο και υψηλής ανάλυσης μέθοδοι για την ανίχνευση του καρκίνου. Τα οπτικά σήματα μπορούν να παρέχουν μοριακές πληροφορίες βιολογικών ιστών και σχετίζονται με την ανατομική δομή του όγκου καθώς και με το μεταβολισμό και τη βιοχημεία του όγκου. Μεταξύ των τεχνολογιών οπτικής απεικόνισης, στην απεικόνιση φθορισμού κοντά στο υπέρυθρο εντός του εύρους μήκους κύματος 650-1700 nm (650–900 nm NIR-I και NIR-II 1.000–1.700 nm) έχει αφιερωθεί τεράστια προσοχή λόγω του χαμηλού αυτοφθορισμού της από οργανισμούς και ιστούς και βελτιώνοντας το βάθος ιστικής διείσδυση και την ευαισθησία (**Εικόνα 21**) [73]. Πιο αναλυτικά, τα πλεονεκτήματα του φθορισμού στην περιοχή του NIR είναι τα ακόλουθα:

1. εξαιρετικό βάθος ιστικής διείσδυσης
2. χαμηλός φθορισμός υποβάθρου
3. εξαιρετικά ευαίσθητη ανίχνευση,
4. μη επεμβατική απεικόνιση,
5. χαμηλό όριο ανίχνευσης,
6. υψηλή χωρική ανάλυση,
7. ταχεία απόδοση,
8. σχετικά χαμηλό κόστος, και
9. έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε προεγχειρητική και διεγχειρητική χειρουργική με οπτική καθοδήγηση [74]

Φυσικά, θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι οργανικές μικρομοριακές χρωστικές είναι οι πρώτες υποψήφιες για παράγοντες σκιαγραφικής κλινικής απεικόνισης λόγω του γρήγορου μεταβολισμού τους σε ζωντανούς οργανισμούς, της χαμηλής φυσιολογικής τοξικότητας και της σαφώς καθορισμένης χημικής δομής. Επιπλέον, οι φθορίζουσες χρωστικές έχουν ιδιαίτερη σημασία λόγω του μικρού τους μεγέθους, της δυνατότητας λεπτής ρύθμισης των ιδιοτήτων τους και της ευκολίας χημικής τροποποίησης. Πολυάριθμες ερευνητικές εργασίες έχουν παρουσιάσει συμμετρικές δομές δότη-δέκτη-δότη (D-A-D) που μειώνουν τη διαφορά ενέργειας μεταξύ LUMO και HOMO τροχιακού, δείχνοντας μεγάλες δυνατότητες στο πεδίο των ανιχνευτών φθορισμού NIR-I και NIR-II με αντιπροσωπευτικό παράδειγμα το πράσινο ινδοκυανίνης (Indocyanine Green, ICG) [75].



Εικόνα 22: Σχηματική αναπαράσταση σκέδασης, αυτοφθορισμού, απορρόφησης και βάθους διείσδυσης φωτός σε βιολογικούς ιστούς σε διαφορετικά μήκη κύματος [74, 76].

1.6.1 Βασικοί μηχανισμοί μεταφοράς φορτίου

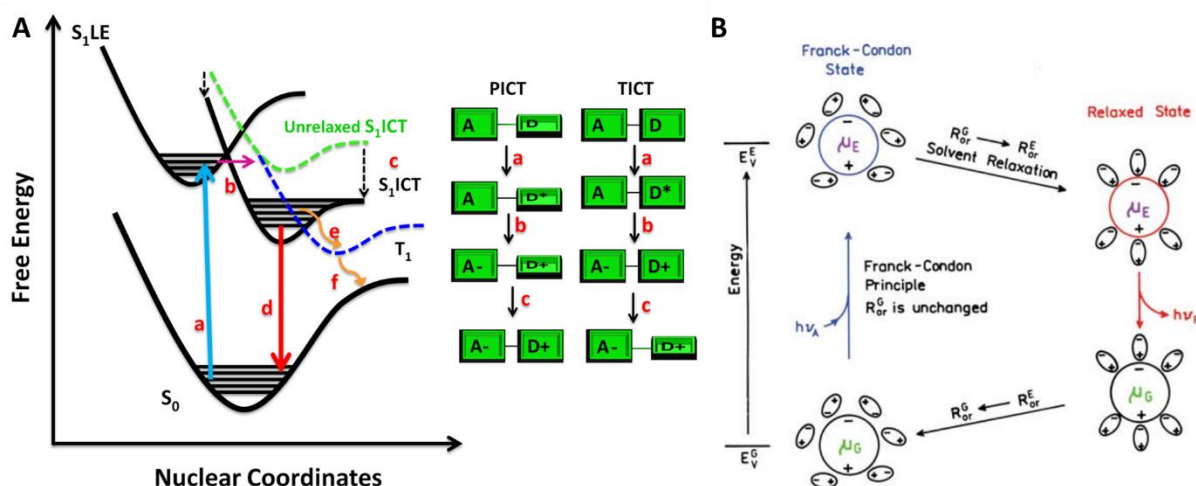
1.6.1.1 Ενδομοριακή Μεταφορά φορτίου (Intramolecular Charge Transfer, ICT)

Η μεταφορά ηλεκτρονίων (Electron Transfer) αποτελεί μια χημική διαδικασία που δεν περιλαμβάνει τη διάσπαση ή τον σχηματισμό χημικών δεσμών αλλά αντίθετα τη μεταφορά ηλεκτρονίων από μια ομάδα πλούσια σε ηλεκτρονιακή πυκνότητα (δότη, donor, D) σε μια ομάδα με έλλειμμα ηλεκτρονιακής πυκνότητας (δέκτη, acceptor, A) [72]. Η μεταφορά φορτίου μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε από ένα πραγματικό αρνητικό φορτίο είτε από ένα μόνο ζεύγος ηλεκτρονίων που υπάρχουν στο μόριο. Το φορτίο μπορεί είτε να υπάρχει ήδη σε ένα μόριο είτε να αναπτυχθεί μετά από κάποια αντίδραση (με αναλύτη). Οι ομάδες που συμμετέχουν (D ή A) μπορεί να βρίσκονται σε δύο διαφορετικά μόρια ή στο ίδιο. Στην δεύτερη περίπτωση η μεταφορά ηλεκτρονιακής πυκνότητας γίνεται ενδομοριακά μέσω ενός π-συστήματος με την ηλεκτρονιακή πυκνότητα να ρέει από τον δότη προς τον δέκτη (D-π-A). Οι φωτοφυσικές ιδιότητες των μορίων που λειτουργούν μέσω ICT εξαρτώνται όχι μόνο από τις ιδιότητες των μορίων (όπως η φύση ή η ισχύς των μονάδων δότη και δέκτη και η απόσταση μεταξύ τους), αλλά και από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες (όπως η πολικότητα του διαλύτη που χρησιμοποιείται για ανάλυση). Συχνά, οι φωτοεπαγόμενες ICT

χαρακτηρίζονται από δομικές αναδιοργανώσεις, οι οποίες επιτρέπουν στο μόριο να προσαρμοστεί στη νέα ηλεκτρονική κατανομή πυκνότητας. Η διαδικασία μεταφοράς φορτίου στο σύστημα ώθησης-έλξης εκτελείται με δομικές αναδιατάξεις όπως η επιτεδοποίηση ή η συστροφή, δίνοντας επίπεδη ενδομοριακή μεταφορά φορτίου (Planar Intramolecular Charge Transfer, PICT) ή συστραμμένη ενδομοριακή μεταφορά φορτίου αντίστοιχα (Twisted Intramolecular Charge Transfer respectively, TICT). Έτσι, κατά τη διάρκεια της ανίχνευσης, η βελτίωση ή η καταστολή της διαδικασίας ICT είναι αναπόφευκτη για τέτοιους ανιχνευτές, οδηγώντας έτσι σε ερυθρά ή μπλε μετατόπιση στο φάσμα εκπομπής, με αποτέλεσμα στις περισσότερες περιπτώσεις, ένα αναλογικό σήμα [77].

Αναλυτικότερα, η συνεστραμμένη ενδομοριακή μεταφορά φορτίου (TICT) είναι μια διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων που συμβαίνει κατά τη φωτοδιέγερση σε μόρια που συνήθως αποτελούνται από ένα τμήμα δότη και δέκτη που συνδέονται με έναν απλό δεσμό. Ο μηχανισμός TICT προτάθηκε για πρώτη φορά το 1973 για να εξηγηθεί ο φθορισμός διαφορετικής έντασης και πιθανώς σε διαφορετικά μήκη κύματος (ερυθρά ή μπλε μετατόπιση), ανάλογα με το χημικό περιβάλλον [78]. Σύμφωνα με το μοντέλο TICT, η επιφάνεια δυναμικής ενέργειας της πρώτης διεγερμένης κατάστασης εμφανίζει δύο τοπικά ελάχιστα (S_1). Κατά τη φωτοδιέγερση, η μελετηθείσα ένωση θα μεταβεί πρώτα σε μια τοπικά διεγερμένη (LE) κατάσταση με επίπεδη γεωμετρία. Προκειμένου να μεταβεί στην κατάσταση TICT, η ομάδα δότη (π.χ., διμεθυλάμινο ομάδα) θα στραφεί στη συνέχεια σε μια κάθετη διεύθυνση. Ο βαθμός του ICT αυξάνεται σταθερά κατά τη διάρκεια αυτής της συστροφής και τελικά ένα ηλεκτρόνιο μεταφέρεται από τον δότη στον δέκτη ηλεκτρονίων [79, 80].

Στο σημείο αυτό να αναφέρουμε ότι έχουν αναπτυχθεί ανιχνευτές TICT, οι οποίοι είναι ανιχνευτές που παραμορφώνονται στη διεγερμένη κατάσταση για να σχηματίσουν συνεστραμμένες καταστάσεις ενδομοριακής μεταφοράς φορτίου. Μια ειδική κατηγορία αυτών είναι οι ανιχνευτές ιώδους, οι οποίοι επιτρέπουν την ενδομοριακή μεταφορά του φορτίου μόνο όταν το μόριο βρεθεί σε περιβάλλον υψηλού ιώδους και διακοπεί η περιστροφή του [81].



Εικόνα 23: A: Σχήμα που απεικονίζει την εξέλιξη της Ενδομοριακής Μεταφοράς Φορτίου (ICT) σε μόρια push-pull. Η κατάσταση S_0 αναπαρίσται από τη μαύρη καμπύλη που βρίσκεται στο κάτω μέρος. (a) Κατακόρυφη διέγερση από S_0 σε κατάσταση τοπικά διεγερμένης S_1 (S_1LE). (b) ICT από S_1LE σε μη χαλαρή κατάσταση S_1ICT . (c) Η μη χαλαρή κατάσταση S_1ICT μπορεί να σταθεροποιηθεί με γεωμετρικές αναδιατάξεις (PICT ή TICT). (d) Αποσύνθεση της κατάστασης S_1ICT μέσω εκπομπής φθορισμού. (e) διασυστημική διασταύρωση (ISC) από κατάσταση S_1ICT σε τριπλή κατάσταση (T_1). (f) Χαλάρωση της κατάστασης T_1 σε S_0 [82]. B: Επιδράσεις των ηλεκτρονικών πεδίων και των πεδίων αντίδρασης προσανατολισμού στην ενέργεια ενός διπόλου σε ένα διηλεκτρικό μέσο, $\mu_E > \mu_G$. Οι μικρότεροι κύκλοι αντιπροσωπεύουν τα μόρια του διαλύτη και τη διπολική ροπή τους [72].

Φωτοεπαγόμενες καταστάσεις εκπομπής μεταφοράς φορτίου, που εξελίσσονται από καταστάσεις τοπικά διεγερμένες (Locally Excited, LE), χαρακτηρίζονται από μια μεγάλη διακύμανση της ηλεκτρικής διπολικής ροπής μεταξύ της θεμελιώδους (S_0) και της πρώτης διεγερμένης κατάστασης (S_1), η οποία είναι υπεύθυνη για τα σολβατοχρωματικά φαινόμενα (φαινόμενα που επηρεάζονται από τον διαλύτη). Η **Εικόνα 23B** αναφέρει ένα σχήμα που απεικονίζει την πορεία από S_0 σε κατάσταση S_1LE που εξελίσσεται σε κατάσταση CT σταθεροποιημένης από τον διαλύτη που οδηγεί σε κατάσταση εκπομπής S_1 χαμηλότερης ενέργειας. Η εκπομπή κατάστασης CT συχνά συνοδεύεται από μεγάλη μετατόπιση Stokes ως συνέπεια της δυναμικής διαλυτοποίησης, ειδικά σε πολικούς διαλύτες [82].

1.6.1.2 Φωτοεπαγόμενη μεταφορά ηλεκτρονίων (Photo-Induced Electron Transfer, PET)

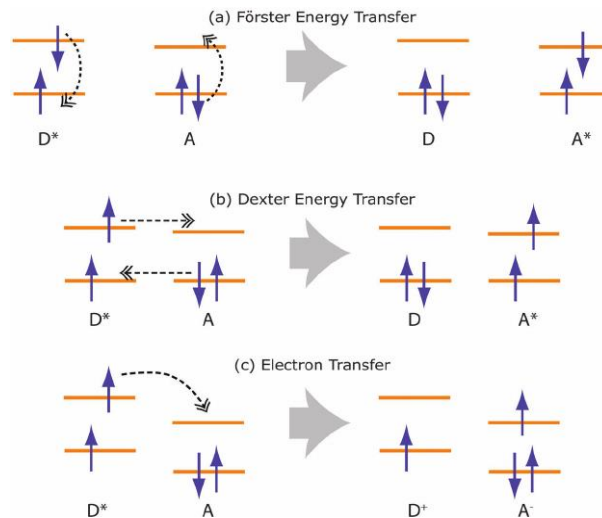
Στην φωτοεπαγόμενη μεταφορά ηλεκτρονίων (PET) λαμβάνει χώρα μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ ενός μορίου που βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση (συνήθως S_1 ή T_1) σε ένα άλλο δεύτερο μόριο που βρίσκεται στη θεμελιώδη κατάσταση. Κατά τη φωτοδιέγερση είτε του δότη είτε του δέκτη ηλεκτρονίων πραγματοποιείται ο σχηματισμός των αντίστοιχων ριζικών ιόντων ($A^{\bullet+}$, $D^{\bullet-}$). Και στις δύο περιπτώσεις η διεγερμένη κατάσταση είναι ευνοϊκή για δύο λόγους. Αρχικά το δυναμικό ιοντισμού είναι μειωμένο και δεύτερον η ηλεκτρονιακή συγγένεια είναι αυξημένη συγκριτικά με τη θεμελιώδη κατάσταση. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η PET απαιτείται αλληλοεπικάλυψη των μοριακών τροχιακών του δότη και του δέκτη ηλεκτρονίων. Η διέγερση του δέκτη ηλεκτρονίων έχει σαν αποτέλεσμα τα HOMO τροχιακά του να παραμένουν κενά από ηλεκτρόνια και έτσι μπορεί να λάβει χώρα μεταφορά ηλεκτρονίων από το δότη. Αντίθετα, όταν πραγματοποιείται διέγερση του δότη ένα ηλεκτρόνιο από τα LUMO τροχιακά του μπορεί εύκολα να μεταφερθεί στο δέκτη ηλεκτρονίων. Η διαδικασία αυτή μπορεί να λάβει χώρα είτε διαμοριακά είτε ενδομοριακά. Η διεργασία αυτή μπορεί επίσης να οδηγήσει σε απόσβεση, όταν συμβεί μεταφορά ηλεκτρονίων από το διεγερμένο φθοροφόρο προς το μόριο ή σε τμήμα κάποιου αποσβέστη [72].

1.6.2 Βασικοί μηχανισμοί μεταφοράς ενέργειας

Μέχρι τώρα έχουμε αναφέρει ότι οι φωτοφυσικές ιδιότητες των χρωμοφώρων επηρεάζονται από τη μεταφορά φορτίου και από την αλληλεπίδραση με το περιβάλλον π.χ. με μόρια του διαλύτη. Παρακάτω θα προσθέσουμε στοιχεία σχετικά με τη μεταφορά ενέργειας και τη δημιουργία συσσωματωμάτων.

1.6.2.1 Μεταφορά ενέργειας συντονισμού Förster (Förster Resonance Energy Transfer, FRET)

Το FRET είναι μια διαδικασία μεταφοράς ενέργειας χωρίς ακτινοβολία μέσω αλληλεπίδρασης διπόλου – διπόλου μεταξύ του δότη και του δέκτη. Πιο συγκεκριμένα, είναι ένα ηλεκτροδυναμικό φαινόμενο που εμφανίζεται μεταξύ ενός μορίου δότη (D) στη διεγερμένη κατάσταση και ενός μορίου δέκτη (A) στη θεμελιώδη κατάσταση. Τα μόρια δότη συνήθως εκπέμπουν σε μικρότερα μήκη κύματος που επικαλύπτονται με το φάσμα απορρόφησης του δέκτη. Η μεταφορά ενέργειας λαμβάνει χώρα χωρίς την εκπομπή φωτονίου και είναι το αποτέλεσμα αλληλεπιδράσεων διπόλου - διπόλου μεγάλης εμβέλειας μεταξύ του δότη και του δέκτη. Ο ρυθμός μεταφοράς ενέργειας εξαρτάται από την έκταση της φασματικής επικάλυψης του φάσματος εκπομπής του δότη με το φάσμα απορρόφησης του δέκτη, την κβαντική απόδοση του δότη, τον σχετικό προσανατολισμό των δίπολων μετάβασης δότη και δέκτη και την απόσταση μεταξύ των μορίων δότη και δέκτη (**Εικόνα 24a**).



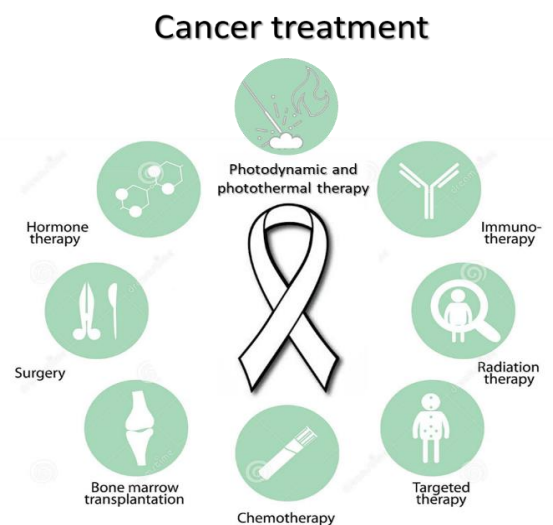
Εικόνα 24:(a) Förster μεταφορά ενέργειας. (b) Η μεταφορά ενέργειας Dexter. Οι οριζόντιες γραμμές είναι τα επίπεδα ενέργειας HOMO και LUMO των μορίων δότη (D) και δέκτη (A). ο αστερίσκος υποδηλώνει διεγερμένη κατάσταση. Τα διακεκομμένα βέλη αντιπροσωπεύουν ταυτόχρονη αναδιάταξη της ηλεκτρονικής διαμόρφωσης. (c) Μεταφορά ηλεκτρονίων από διεγερμένο μόριο δότη (D^*) σε ουδέτερο δέκτη (A) [83].

1.6.2.2 Μεταφορά ενέργειας Dexter (Dexter energy transfer, DET)

Κατά την διεργασία αυτή υπάρχει ένας διεγερμένος δότης που έχει ένα ηλεκτρόνιο στο LUMO τροχιακό του. Αυτό το ηλεκτρόνιο μεταφέρεται στον δέκτη. Στη συνέχεια, ο δέκτης μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο πίσω στον δότη. Αυτό το ηλεκτρόνιο προέρχεται από το τροχιακό HOMO του δέκτη, έτσι ο δέκτης αφήνεται σε διεγερμένη κατάσταση. Η ανταλλαγή ηλεκτρονίων είναι παρόμοια με το FRET επειδή η ενέργεια μεταφέρεται σε έναν δέκτη. Αυτός ο τρόπος μεταφοράς ενέργειας εξαρτάται από τη φασματική επικάλυψη του δότη και του δέκτη, ακριβώς όπως το FRET. Σε αντίθεση με το FRET, η αλληλεπίδραση Dexter είναι ένα κβαντομηχανικό φαινόμενο που δεν έχει ανάλογο φαινόμενο στην κλασική ηλεκτροδυναμική (Εικόνα 24b).

1.7 Θεραπεία καρκίνου

Το βήμα που ακολουθεί μετά την διάγνωση του καρκίνου είναι η θεραπεία του. Έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τύποι θεραπείας του καρκίνου, οι οποίοι προτείνονται σε ασθενείς ανάλογα από τον τύπο καρκίνου που έχουν. Κάποιος μπορεί να ακολουθεί μία μορφή θεραπείας αλλά συνήθως πραγματοποιείται συνδυασμός μεθόδων (Εικόνα 25).



Εικόνα 25:Μορφές θεραπείας καρκίνου.

Για να βρεθεί ο κατάλληλος τύπος θεραπείας συνήθως πραγματοποιείται δοκιμή βιοδεικτών. Ο όρος αυτός περιγράφει έναν τρόπο αναζήτησης γονιδίων, πρωτεϊνών και άλλων ουσιών (που ονομάζονται βιοδείκτες ή δείκτες όγκου) που μπορούν να παρέχουν πληροφορίες για τον καρκίνο. Οι διάφορες μορφές θεραπεία συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2: Μορφές θεραπείας καρκίνου [84].

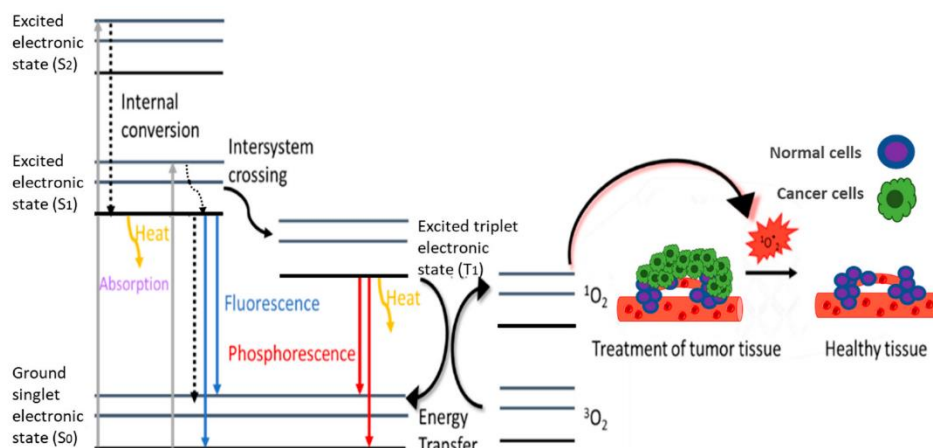
Θεραπεία	Περιγραφή
Χημειοθεραπεία	Είναι ένας τύπος θεραπείας του καρκίνου που χρησιμοποιεί φάρμακα για να καταστρέψει τα καρκινικά κύτταρα. Το πρόβλημα με την χημειοθεραπεία είναι ότι πέραν από καρκινικά κύτταρα καταστρέφονται και τα υγιή χωρίς εκλεκτικότητα. Αυτό προκαλεί παρενέργειες και καταπόνηση του οργανισμού.
Ορμονοθεραπεία	Είναι μια θεραπεία που επιβραδύνει ή σταματά την ανάπτυξη των καρκίνων του μαστού και του προστάτη που χρησιμοποιούν ορμόνες για την ανάπτυξή τους.
Υπερθερμία	Είναι ένας τύπος θεραπείας κατά την οποία ο ιστός του σώματος θερμαίνεται έως και 113 °F ή 45 °C για να βοηθήσει στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων με μικρή ή καθόλου βλάβη στον φυσιολογικό ιστό.
Ανοσοθεραπεία	Είναι ένας τύπος θεραπείας για τον καρκίνο που βοηθά το ανοσοποιητικό σύστημα να καταπολεμήσει τον καρκίνο, ενεργοποιώντας ειδικά κύτταρα του οργανισμού, τα T-λεμφοκύτταρα που επιτίθενται και καταστρέφουν τους καρκινικούς όγκους.
Ακτινοθεραπεία	Χρησιμοποιεί υψηλές δόσεις ακτινοβολίας για να θανατώσει τα καρκινικά κύτταρα και να συρρικνώσει τους όγκους.
Μεταμόσχευση Βλαστοκυττάρων	Είναι διαδικασίες που αποκαθιστούν βλαστοκύτταρα που αναπτύσσονται σε κύτταρα αίματος σε άτομα που έχουν καταστραφεί τα δικά τους από υψηλές δόσεις χημειοθεραπείας ή ακτινοθεραπείας.
Χειρουργική επέμβαση	Όταν χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου, η χειρουργική επέμβαση είναι μια διαδικασία κατά την οποία ένας χειρουργός αφαιρεί τον καρκίνο από το σώμα.
Στοχευμένη Θεραπεία	Είναι ένας τύπος θεραπείας για τον καρκίνο που στοχεύει στοιχεία των καρκινικών κυττάρων που τα βοηθούν να αναπτυχθούν, να διαιρεθούν και να εξαπλωθούν.
Φωτοδυναμική Θεραπεία	Χρησιμοποιεί ένα φάρμακο που ενεργοποιείται από το φως για να καταστρέψει τα καρκινικά κύτταρα.

1.7.1 Φωτοθεραπεία

Η φωτοθεραπεία είναι μια αναδυόμενη τεχνική για τη θεραπεία του καρκίνου. Χρησιμοποιεί ακτινοβολία σε συγκεκριμένο μήκος κύματος και μέσω ενός φωτοθεραπευτικού παράγοντα προκαλεί φωτοθεραπευτική κυτταροτοξικότητα. Θεωρείται μια προηγμένη επιλογή θεραπείας σε σύγκριση με τις τρέχουσες ογκολογικές προσεγγίσεις. Έχει το πλεονέκτημα της μη επεμβατικότητας, εξαιρετικής χωροχρονικής δυνατότητας ελέγχου και ελάχιστες παρενέργειες. Ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης, η φωτοθεραπεία μπορεί να χωριστεί σε φωτοθερμική (Photothermal Therapy, PTT) και φωτοδυναμική θεραπεία (Photodynamic Therapy, PDT). Το PTT περιλαμβάνει την αύξηση της θερμοκρασίας σε ένα συγκεκριμένο μέρος του ανθρώπινου σώματος πάνω από την κανονική τιμή των 37 °C για μια συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Η θερμοκρασία είναι βασική παράμετρος για τη βιοδιαθεσιμότητα των βιολογικών συστημάτων. Η αξιοποίηση αυτής της γνώσης επιτρέπει την ανάπτυξη παραγόντων που μετατρέπουν την ενέργεια ακτινοβολίας σε θερμική ενέργεια μέσω δονητικών ερεθισμάτων με τελική συνέπεια την αύξηση της θερμοκρασίας σε κυτταροτοξικό επίπεδο (41–48 °C) προκαλώντας μετουσίωση πρωτεϊνών, οξειδωτικό στρες και πηκτική νέκρωση. Οι πιο σημαντικές παράμετροι της διαδικασίας είναι η ένταση και η διατήρηση της αύξησης της θερμοκρασίας, η οποία θα πρέπει να είναι εντός καθορισμένων πλαισίων, για τον έλεγχο της διαδικασίας. Το PDT χρησιμοποιεί έναν φωτοευαισθητοποιητή (photosensitizer, Ps) [85-87], όπως πορφυρίνες, χλωρίνες και φθαλοκυανίνες, για να απορροφήσει την ενέργεια του φωτός και να την κατευθύνει σε ένα υπόστρωμα που προκαλεί κυτταροτοξικότητα. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, αυτό το υπόστρωμα είναι μοριακό οξυγόνο για το οποίο η κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας είναι τριπλής κατάστασης. Τα ηλεκτρόνια μπορούν να περάσουν μέσω διασυστημικής διασταύρωσης διασχίζοντας από το διεγερμένο υπόστρωμα του PS στη βασική τριπλή κατάσταση του οξυγόνου, προκαλώντας τη διέγερσή του και καταλήγοντας στο σχηματισμό οξυγόνου στη μονή διεγερμένη κατάσταση ($^1\text{O}_2^*$), η οποία είναι κυτταροτοξική. Ο φωτοευαισθητοποιητής είναι απαραίτητος για να λειτουργεί ως «φορέας ενέργειας», να απορροφά ακτινοβολία υψηλής ενέργειας και να τη μεταφέρει σε άλλα είδη χωρίς να καταστρέφει τον ιστό [88].

Όπως περιγράφηκε προηγουμένως, όταν η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αλληλεπιδρά με ένα μόριο μπορεί να απορροφήσει ποσότητα ενέργειας ίση με τη διαφορά ενέργειας μεταξύ της βασικής κατάστασης και μιας υψηλότερης διεγερμένης κατάστασης (γκρίζες γραμμές στην **Εικόνα 26**). Κατά τη διάρκεια της αποδιέγερσης, το μόριο χαλαρώνει σε χαμηλότερα δονητικά επίπεδα μέσω δονητικής χαλάρωσης (καμπύλη μαύρη διακεκομμένη γραμμή στην **Εικόνα 26**) ή σε καταστάσεις χαμηλής ενέργειας της ίδιας περιστροφής (ευθείες μαύρες διακεκομμένες γραμμές στην **Εικόνα 26**) και τελικά χαλαρώνει στο χαμηλότερο επίπεδο δόνησης της χαμηλότερης διεγερμένης κατάστασης S_1 . Από αυτή τη στιγμή και μετά μπορεί να ακολουθήσει διαφορετικά μονοπάτια για περαιτέρω διέγερση. Μια περίπτωση είναι ο φθορισμός, δηλαδή η χαλάρωση στην οποία η πολλαπλότητα δεν αλλάζει και παράγεται φωτόνιο (μπλε γραμμή στην **Εικόνα 26**). Εναλλακτικά, υπάρχει επίσης χαλάρωση στη βασική κατάσταση που δεν οδηγεί σε παραγωγή φωτονίων, αλλά η ενέργεια μεταφέρεται μέσω της θερμότητας στο περιβάλλον (PTT), το οποίο μπορεί τελικά να οδηγήσει επίσης στο φωτοακουστικό αποτέλεσμα μετά τη διαστολή του περιβάλλοντος υλικού. Είναι επίσης δυνατό για ένα διεγερμένο χρωμοφόρο να εξέλθει από τη μονή πολλαπλότητα μέσω της διασυστημικής διασταύρωσης, μια απαγορευμένη μετάβαση όπου η πολλαπλότητα αλλάζει από την απλή κατάσταση σε μια τριπλή κατάσταση. Στη συνέχεια, μπορεί να χαλαρώσει μέσω φωσφορισμού (παρουσιάζεται με κόκκινη γραμμή στην **Εικόνα 26**), ή μπορεί να αλληλεπιδράσει με κοντινά μόρια τριπλής κατάστασης, όπως το οξυγόνο (O_2). Το οξυγόνο έχει τριπλό spin στη θεμελιώδη κατάσταση και μετά από μια τέτοια αλληλεπίδραση μετατρέπεται σε οξυγόνο απλής κατάστασης ($^1\text{O}_2^*$), μια τοξική μορφή που καταστρέφει τα κοντινά βιολογικά συστήματα (**Εικόνα 6**). Αυτή είναι η αρχή της φωτοδυναμικής θεραπείας.

Οι αντικαρκινικές επιδράσεις της PDT προέρχονται από 3 αλληλένδετους μηχανισμούς: άμεσες κυτταροτοξικές επιδράσεις στα καρκινικά κύτταρα, βλάβη στα αγγεία του όγκου και πρόκληση ισχυρής φλεγμονώδους αντίδρασης που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη συστηματικής ανοσίας. Η σχετική συνεισφορά αυτών των μηχανισμών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο και τη δόση του PS που χρησιμοποιείται, το χρόνο μεταξύ της χορήγησης του PS και της έκθεσης στο φως, τη συνολική δόση φωτός και τον ρυθμό ροής του, τη συγκέντρωση οξυγόνου του όγκου και ίσως άλλα ακόμα φτωχά αναγνωρισμένες μεταβλητές. Σχετικά με την πηγή φωτός, η περιοχή μεταξύ 600 και 1200 nm ονομάζεται συχνά οπτικό παράθυρο ιστού. Ωστόσο, το φως μπορεί να δημιουργήσει $^1\text{O}_2$ μέχρι περίπου 800 nm, επειδή τα μεγαλύτερα μήκη κύματος δεν έχουν επαρκή ενέργεια για να ξεκινήσουν μια φωτοδυναμική αντίδραση. Οι παραγόμενες ρίζες έχουν πολύ μικρή διάρκεια ζωής (περίπου 10-320 νανοδευτερόλεπτα), περιορίζοντας τη διάχυσή του μόνο σε περίπου 10 nm έως 55 nm στα κύτταρα. Έτσι, η φωτοδυναμική βλάβη θα συμβεί πολύ κοντά στην ενδοκυτταρική θέση του PS. Επομένως εάν ο PS συσσωρεύεται ειδικά σε καρκινικά κύτταρα, τα υπόλοιπα υγιή δεν επηρεάζονται από την εν λόγω θεραπεία [76].



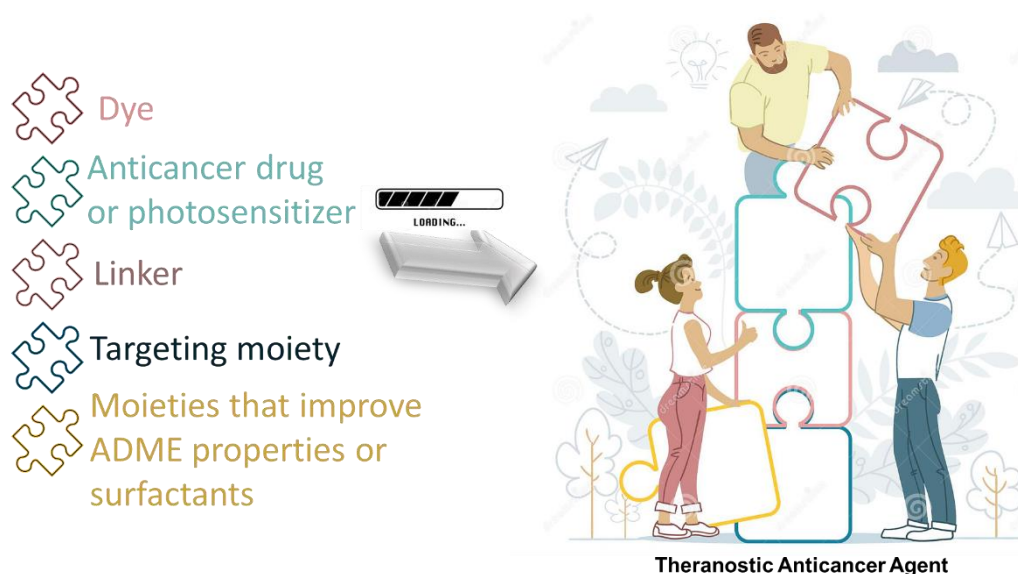
Εικόνα 26: Παρουσιάζεται διάγραμμα Jablonski που δείχνει τις βασικές διεργασίες που μπορούν να πραγματοποιηθούν όταν ένα μόριο ακτινοβολείται με ένα κατάλληλο μήκος κύματος ακτινοβολίας. Παρουσιάζεται επίσης τη βασική αρχή της PDT και πώς καταστρέφει τα καρκινικά κύτταρα ενός ιστού (τα πράσινα κύτταρα καταστρέφονται) [69].

Κλινικά έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο σε: όγκους δέρματος, όγκους κεφαλής και λαιμού, όγκους πεπτικού συστήματος, όγκους ουροποιητικού συστήματος (καρκίνος προστάτη, καρκίνος ουροδόχου κύστης), στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και του μεσοθηλιώματος, και στους όγκους εγκεφάλου [76].

Βέβαια ούτε αυτή η τεχνική αποτελεί πανάκεια για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Παραμένουν ακόμη ανοιχτές προκλήσεις που προκύπτουν από τα εξής μειονεκτήματα για την φωτοδυναμική θεραπεία: (i) του περιορισμένου βάθους ιστικής διείσδυσης του φωτός, το οποίο περιορίζει την παραδοσιακή PDT σε επιφανειακούς όγκους. (ii) η εξάρτηση από το οξυγόνο δεν επιτρέπει τη θεραπεία με PDT υποξικών όγκων. (iii) το φως μπορεί να περιπλέξει τα φωτοθεραπευτικά αποτελέσματα λόγω της παράλληλης παραγωγής θερμότητας. (iv) Η ειδική παροχή PSs σε υποκυτταρικά οργανίδια για την άσκηση αποτελεσματικής τοξικότητας παραμένει ένα ζήτημα και (v) παρενέργειες από ανεπιθύμητη ενεργοποίηση λευκού φωτός και αυτο-κατάλυση των παραδοσιακών PS. Αναφορικά με την φωτοθερμική θεραπεία το βασικό μειονέκτημα είναι η αδυναμία ελέγχου της αύξησης της θερμοκρασίας [89].

1.8 Αρχές Σχεδιασμού που Διέπουν την Ανάπτυξη Θεραπογνώστικών Αντικαρκινικών Παραγόντων

Ένας θεραπευγνώστικός παράγοντας συνήθως αποτελείται από έναν παράγοντα απεικόνισης συζευγμένο με έναν θεραπευτικό παράγοντα μέσω ενός διαχωριστή ή ενός συνδέτη. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ένας μόνο παράγοντας έχει και οπτικές και θεραπευτικές ιδιότητες. Ένα τέτοιο αντιπροσωπευτικό παράδειγμα είναι το πράσινο ινδοκυανίνης (Indocyanine Green, ICG), μια μικρή μοριακή χρωστική που έχει οπτικές ιδιότητες που οφείλονται στον φθορισμό, αλλά και στην φωτοακουστική απεικόνιση. Ταυτόχρονα όμως έχει ικανότητα φωτομετατροπής (θεραπεία), όπως φαίνεται από τους Zhong et al. [90, 91]. Επιπλέον, στην δομή του ανιχνευτή μπορεί να συνδεθεί ένα τμήμα στόχευσης. Τέλος, μπορούν να συνδεθούν ομάδες, συνήθως για να ενισχύσουν τις φωτοφυσικές του ιδιότητες και το φαρμακοκινητικό του προφίλ και, επομένως, να βελτιώσουν τις ιδιότητες απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion, ADME) (Εικόνα 27) [92].



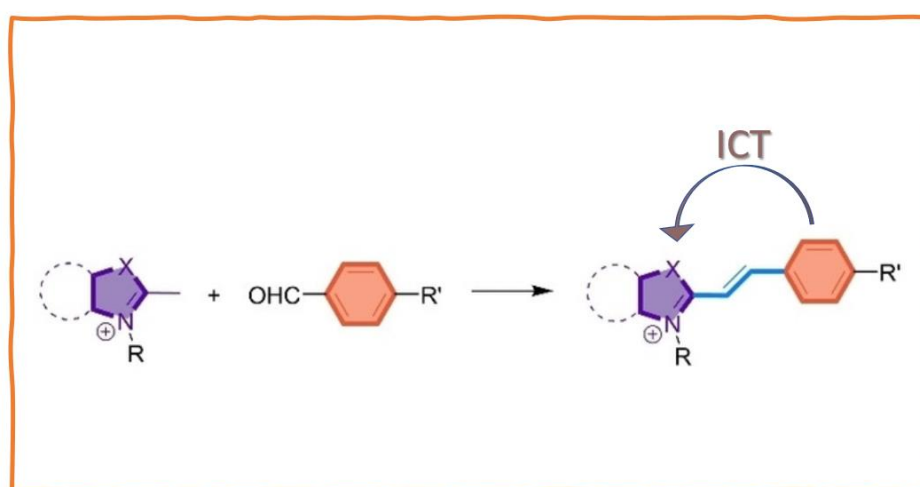
Εικόνα 27: Η γενικευμένη αρχιτεκτονική για την ανάπτυξη ενός θεραπευγνώστικού παράγοντα με ιδιότητες απεικόνισης φθορισμού, σχεδιασμένο να απεικονίζει και να θεραπεύει τα κακοήγη καρκινικά κύτταρα. Τα διαφορετικά συστατικά του «θεραπευγνώστικού παζλ» μπορούν να συνδυαστούν με πολλούς και διαφορετικούς τρόπους για να προστεθούν οι επιθυμητές ιδιότητες στο τελικό πλήρως συναρμολογημένο σύζευγμα.

1.8.1 Επιλογή του παράγοντα απεικόνισης

Η ικανοποιητική απεικόνιση φθορισμού NIR καρκίνου απαιτεί εξαιρετικούς ανιχνευτές NIR με ανώτερες χημικές και φωτοφυσικές ιδιότητες. Ένας ιδανικός ανιχνευτής NIR πρέπει να λειτουργεί στη φασματική περιοχή NIR, με μεγάλη μετατόπιση Stokes, υψηλό συντελεστή μοριακής απορρόφησης και κβαντική απόδοση για έντονο φθορισμό, επαρκή χημική σταθερότητα και φωτοσταθερότητα σε διαλύτες, ρυθμιστικά διαλύματα ή βιολογικά υγρά για απεικόνιση. Οι οργανικές χρωστικές που δραστηριοποιούνται στην περιοχή NIR έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετά στις βιοϊατρικές εφαρμογές. Σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί στην πρόσφατη ανάπτυξη χρωστικών NIR (συμπεριλαμβανομένων χρωστικών κυανίνης, σκουαρίνης, φθαλοκυανινών, παραγώγων πορφυρίνης και αναλόγων BODIPY (BOronSIPYrromethane)), που διαθέτουν βελτιωμένη χημική σταθερότητα και φωτοσταθερότητα, υψηλή ένταση φθορισμού και μεγάλη διάρκεια ζωής φθορισμού [73].

1.8.1.1 Χρωστικές ημικυανίνης

Η ανακάλυψη ενός εγγύς υπέρυθρου (NIR, 650–900 nm) φθορίζοντος χρωμοφόρου ημικυανίνης με υψηλή δομική προσαρμοστικότητα είναι μεγάλης σημασίας στον τομέα της ανίχνευσης, της βιοαπεικόνισης και των ιατρικών θεραπευτικών εφαρμογών. Παρουσιάζει πολλά εξαιρετικά πλεονεκτήματα, όπως απορρόφηση και εκπομπή στην περιοχή NIR, ρυθμιζόμενες φασματικές ιδιότητες, υψηλή φωτοσταθερότητα καθώς και μεγάλη μετατόπιση Stokes. Αυτές οι ιδιότητες είναι ανώτερες από εκείνες των συμβατικών φθοροφόρων, όπως η κουμαρίνη, η φλουορεσκεΐνη, τα ναφθαλιμίδια και η ροδαμίνη. Οι ερευνητές έχουν σημειώσει αξιοσημείωτη πρόοδο στην ανάπτυξη πολυλειτουργικών ανιχνευτών φθορισμού με βάση τη δραστηριότητα που βασίζονται σε σκελετούς ημικυανίνης για την παρακολούθηση ζωτικών βιομορίων σε ζώντα συστήματα μέσω της παραγωγής φθορισμού/φωτοακουστικών σημάτων και την ενσωμάτωση διάγνωσης και θεραπείας ασθενειών με χημειοθεραπεία ή φωτοθερμική/φωτοδυναμική θεραπεία ή συνδυασμό θεραπείας [93].



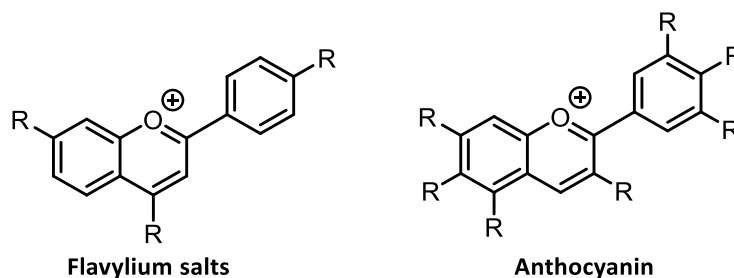
Εικόνα 28: Γενική δομή φθοροφόρων ημικυανίνης και κλασική συνθετική οδός σε ικρίωματα ημικυανίνης. Απεικόνιση του ICT φαινομένου [94].

Οι χρωστικές ημικυανίνης, οι οποίες διαθέτουν ένα μοτίβο δότη-π-δέκτη (D-π-A), είναι πολλά υποσχόμενα φθοροφόρα για βιοαπεικόνιση στην περιοχή NIR. Σε σύγκριση με ορισμένες παραδοσιακές χρωστικές NIR, όπως η κυανίνη με χαμηλή κβαντική απόδοση φθορισμού ($\Phi < 0.25$), οι ημικυανίνες NIR με εξαιρετικά διαφορετική δομική δυνατότητα συντονισμού μπορούν να τροποποιηθούν για να φτάσουν σε υψηλή κβαντική απόδοση φθορισμού ($\Phi \approx 0.35-0.55$), η οποία είναι κατάλληλη για βιοαπεικόνιση. Οι μηχανισμοί ανίχνευσης που βασίζονται στο φαινόμενο ICT (Εικόνα 28) των χρωστικών ημικυανίνης αποτελούν τη βάση της βιοαπεικόνισης προσανατολισμένης στην αντίδραση. Λόγω της μεγάλης ποικιλίας δομικής δυνατότητας συντονισμού των ικρίωμάτων ημικυανίνης, το ICT φαινόμενό τους μπορεί να διαμορφωθούν είτε αλλάζοντας την ικανότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων, είτε παρεμβαίνοντας στα π-συζευγμένα συστήματα ημικυανινών. Μεταβάλλοντας τους δέκτες πυριδινίου και τους αρωματικούς δότες, έχει δημιουργηθεί μια σημαντική βιβλιοθήκη διαφορετικών ανιχνευτών ημικυανίνης με ευρύ φάσμα εκπομπών. Γενικά, η αύξηση της ικανότητας μεταφοράς ηλεκτρονίων του δότη επιτρέπει μια μετατόπιση προς το ερυθρό στα φάσματα απορρόφησης και εκπομπής και αντίστροφα [94].

1.8.1.2 Χρωστικές άλατος φλαβυλίου

Τα συνθετικά άλατα φλαβυλίου έχουν την ίδια βασική δομή με τις ανθοκυανίνες και η μελέτη της χημείας και της φωτοχημείας τους είναι εκτεταμένη τα τελευταία χρόνια. Το χρώμα και οι

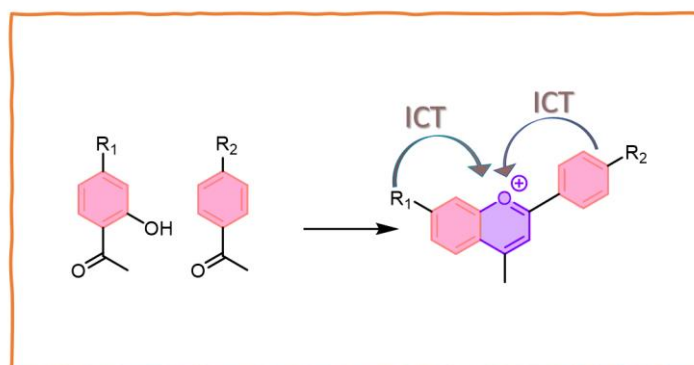
φυσικοχημικές ιδιότητές τους έχουν διερευνηθεί σε μεγάλο βαθμό και εξαρτώνται κυρίως από τη φύση και τη θέση των λειτουργικών ομάδων που συνδέονται με τον σκελετό.



Εικόνα 29: Γενική δομή αλάτων φλαβυλίου και ανθοκυανινών.

Οι ανθοκυανίνες (**Εικόνα 29**), μια σημαντική υποομάδα φλαβονοειδών, είναι οι πανταχού παρούσες χρωστικές σε πολλά φυτά, ιδιαίτερα των λουλουδιών και των φρούτων. Οι ανθοκυανίνες έχουν χαρακτηριστικές φυσικοχημικές ιδιότητες που τους προσδίδουν το μοναδικό χρώμα και τη σταθερότητά τους. Λόγω της εξαιρετικά αντιδραστικής φύσης τους, αυτά τα μόρια είναι ευαίσθητα στις αντιδράσεις αποδόμησης. Οι κύριοι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τη χημεία των ανθοκυανινών και, ως εκ τούτου, τη σταθερότητα και το χρώμα τους είναι το οξύγνο, η θερμοκρασία, το φως, τα ένζυμα και το pH [95, 96].

Τα άλατα φλαβυλίου εμφανίζουν πολλές κοινές ιδιότητες με τις ανθοκυανίνες με τη διαφορά ότι ανάλογα με τους υποκαταστάτες τους μπορούν να αναπτύξουν νέες προηγμένες ιδιότητες και να βελτιώσουν τις ήδη υπάρχουσες. Βελτίωση της φωτοσταθερότητας και της σταθερότητας σε διαφορετικές τιμές pH, μπορεί να οδηγήσει σε νέες χρωστικές που, ικανές για βιοαπεικόνιση και νέες μορφές θεραπείας. Στην **Εικόνα 30**, φαίνεται ένα παράδειγμα τέτοιων χρωστικών που διαθέτουν σύστημα δότη-δέκτη-δότη, που συνδέονται με π-συζυγιακό σύστημα, δηλαδή παρουσιάζουν φθορισμό μέσω φαινομένου ICT.

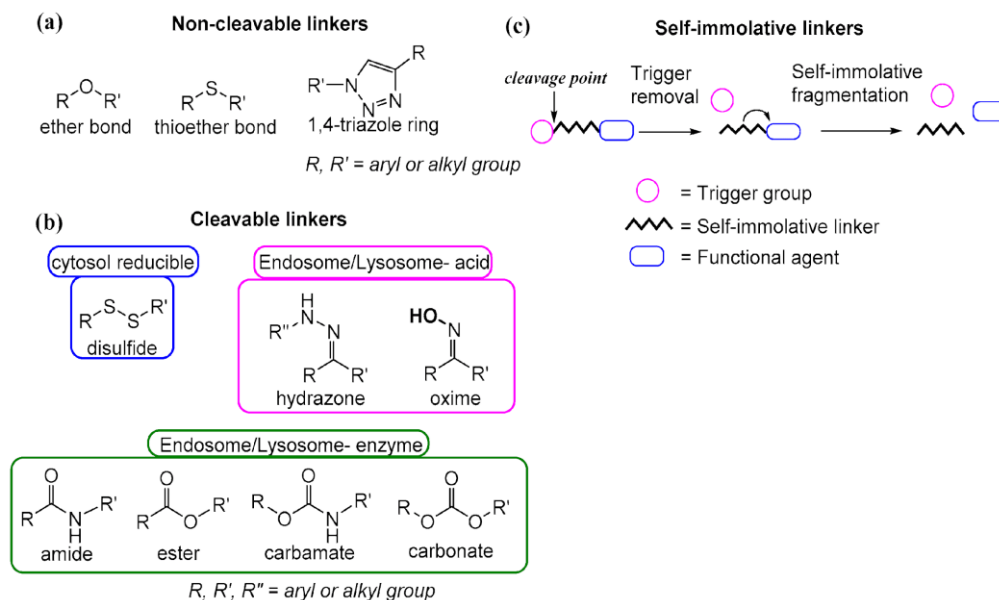


Εικόνα 30: Γενική δομή βαφών φλαβυλικών αλάτων και κλασική συνθετική οδός σε ικρίωματα φλαβυλικού άλατος. Απεικόνιση του ICT φαινομένου [85].

1.8.2 Επιλογή του συνδέτη

Κατά το σχεδιασμό ενός θεραπευτικού παράγοντα, ο ρόλος του συνδέτη (το τμήμα που συνδέει τον παράγοντα απεικόνισης με το φάρμακο και/ή με το στοιχείο στόχευσης όγκου) έχει μεγάλη σημασία. Ο συνδέτης θα πρέπει να επιλέγεται προσεκτικά, έτσι ώστε να μην διαταράσσεται η αντικαρκινική αποτελεσματικότητα του φαρμάκου, το στοιχείο συγγένειας υποδοχής όγκου ή οι φυσικοχημικές ιδιότητες του παράγοντα απεικόνισης. Επιπλέον, η σταθερότητα στην περιφερική κυκλοφορία του αίματος είναι κρίσιμη για την αποφυγή της πρόωρης και μη ειδικής απελευθέρωσης του φαρμάκου. Υπάρχει μια τεράστια ποικιλία συνδετών που μπορούν να ταξινομηθούν με βάση το

μήκος, τη σταθερότητα, τον μηχανισμό απελευθέρωσης, τις λειτουργικές ομάδες και την υδροφιλικότητα/υδροφοβία τους. Σύμφωνα με τη σταθερότητά τους, τις λειτουργικές ομάδες και τον μηχανισμό απελευθέρωσης διακρίνονται συνήθως σε δύο γενικές κατηγορίες: μη διασπάσιμους και διασπάσιμους συνδέτες.



Εικόνα 31: Κατηγοριοποίηση συνδετών που χρησιμοποιούνται σε θεραπευτικούς παράγοντες: (α) μη διασπόμενοι συνδέτες, (β) διασπόμενοι συνδέτες, (γ) αυτοδιασπόμενοι συνδέτες [69].

Η χρήση ενός μη διασπάσιμου συνδέτη μπορεί να οδηγήσει σε παρατεταμένη ενζυματική και/ή χημική σταθερότητα του τελικού θεραπευτικού παράγοντα. Η δομή τους, επομένως, παραμένει ανεπηρέαστη από τις υδρολάσεις, τις αλλαγές του pH και την ακτινοβολία. Τα μη αποικοδομήσιμα συζεύγματα συνήθως περιλαμβάνουν έναν δεσμό θειοαιθέρα, έναν αιθερικό δεσμό ή έναν δακτύλιο τριαζόλης (**Εικόνα 31α**).

Αντίθετα, οι θεραπευτικοί παράγοντες με διασπόμενους δεσμούς χρησιμοποιούν βιοαποικοδομήσιμους δεσμούς που μπορούν να υδρολυθούν από ένα συγκεκριμένο χημικό ή ενζυμικό ερέθισμα. Στην πραγματικότητα, για να ενισχυθεί η εξειδίκευση για το μικροπεριβάλλον του όγκου, οι συνδέτες έχουν σχεδιαστεί για να διασπώνται από βιοδείκτες καρκίνου ή μοναδικά στοιχεία του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Τέτοια μόρια μπορούν επιλεκτικά να απελευθερώσουν το δραστικό φάρμακο μέσα στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Οι διασπάσιμοι συνδέτες μπορούν να υποδιαιρεθούν σε τέσσερις κατηγορίες: αποικοδομήσιμοι στο κυττόςολιο (δισουλφίδιο). αποικοδομήσιμο σε λυσοσώματα από ένα ένζυμο (συνήθως εστέρας, αμίδιο και καρβαμιδικό). αποικοδομήσιμο σε λυσοσώματα από όξινες συνθήκες (υδραζόνη και οξίμη). και μπορεί να διασπαστεί από εξωτερικά ερεθίσματα (π.χ. θερμοκρασία, μαγνητικό πεδίο, υπέρηχος και φως). Συγκεκριμένα, στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων, η υπερέκφραση της γλουταθειόνης είναι χαρακτηριστική και μπορεί να διασπάσει διάφορους χημικούς δεσμούς, συμπεριλαμβανομένων των συνδετικών ουσιών δισουλφιδίου. Μεταξύ των δεσμών που αποσυντίθενται από όξινες συνθήκες, ο πιο δημοφιλής είναι ο δεσμός υδραζόνης. Μπορεί να υδρολυθεί για να δώσει τη σχετική κετόνη και υδραζίδιο σε λυσοσώματα και ενδοσώματα κυττάρων όγκου (εύρος pH 4.3–5.5). Τα υδρολυτικά ένζυμα μπορούν να διασπάσουν τυχαίους εστερικούς ή αμιδικούς δεσμούς, ενώ ένζυμα όπως η καθεψίνη B και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της μήτρας αναγνωρίζουν και διασπούν συγκεκριμένες αλληλουχίες αμινοξέων [97, 98] (**Εικόνα 31β**).

Μια άλλη κατηγορία που επικαλείται συχνά κατά την ανάπτυξη των θεραπευτικών παραγόντων περιλαμβάνει τους αυτοδιασπόμενους συνδέτες. Τέτοιοι συνδέτες περιλαμβάνουν μια ομάδα ενεργοποιήσιμη από συγκεκριμένο ερέθισμα, συζευγμένη με ένα μόριο πυρήνα (π.χ., 4-υδροξυβενζυλική αλκοόλη). Η ανταπόκριση στο ερέθισμα προκαλεί αυθόρμητη ενδομοριακή τροποποίηση του συζεύγματος. Η διάσπαση της ομάδας ενεργοποίησης οδηγεί στη δημιουργία ενός ασταθούς ενδιάμεσου, το οποίο μετά από διαδοχική μεταφορά ηλεκτρονίων απελευθερώνει το δραστικό φάρμακο. Η διαδικασία κατακερματισμού μπορεί να συμβεί μέσω 1.4-, 1.6-, ή 1.8-διάσπασης [69, 99] **(Εικόνα 31c)**.

1.8.3 Επιλογή του παράγοντα στόχευσης

Η καλύτερη κατανόηση της φυσιολογίας και του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων εξοπλίζει τους επιστήμονες με νέες και καινοτόμες στρατηγικές χορήγησης φαρμάκων. Οι πιθανοί στόχοι περιλαμβάνουν οποιαδήποτε μόρια που είναι υπερεκφρασμένα σε καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Ως εκ τούτου, ένας στοχευμένος θεραπευτικός παράγοντας μπορεί να περιλαμβάνει ένα στοιχείο που σχετίζεται με το μικροπεριβάλλον του όγκου που συνήθως αλληλεπιδρά με καρκινικούς βιοδείκτες και προάγει τη συσσώρευση του συζεύγματος στην περιοχή του όγκου. Ο θεραπευτικός παράγοντας μπορεί να συζευχθεί απευθείας με ένα τέτοιο στοιχείο (π.χ. μικρό οργανικό μόριο, πεπτίδιο, πρωτεΐνη, αντίσωμα) ή μπορούν και τα δύο να ενσωματωθούν σε πιο πολύπλοκες δομές όπως τα νανοσωματίδια για να εκμεταλλευτούν την παθητική στόχευση μέσω της ενισχυμένης διαπερατότητας και το φαινόμενο κατακράτησης (EPR), το οποίο οδηγεί στη συσσώρευσή τους στον όγκο. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα είναι τα ανάλογα φυλλικού οξέος, που στοχεύουν τον υποδοχέα φυλλικού οξέος (χημικά μόρια), το πεπτίδιο cRGD, το οποίο στοχεύει την $\alpha_v\beta_3$ -ιντεγκρίνη.

Οι περισσότεροι συμπαγείς όγκοι εμφανίζουν αυξημένη ανάγκη για οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά. Έτσι, εμφανίζουν υψηλά επίπεδα παραγόντων αγγειακής διαπερατότητας, όπως βραδυκίνη, μονοξείδιο του αζώτου (NO), υπεροξυνιτρώδη (ONOO^-) και πρωτεϊνικός παράγοντας αγγειακής διαπερατότητας, οδηγώντας σε αγγειογένεση. Ο γρήγορος ρυθμός ανάπτυξής τους έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων όγκου με ελαττωματική μορφολογία και ανώμαλη αρχιτεκτονική σε σύγκριση με τα φυσιολογικά. Αυτό διευκολύνει τη διείσδυση διάφορων σκευασμάτων φαρμάκων (π.χ. νανοσωματιδίων) στη θέση του όγκου. Η συσσώρευση γίνεται ακόμη πιο αποτελεσματική εάν η παθητική στόχευση συνδυάζεται με συγκεκριμένα τμήματα στόχευσης, όπως αντισώματα και συγκεκριμένα μόρια που αναφέρονται παραπάνω (ενεργητική στόχευση) [69].

ΣΚΟΠΟΣ

Ο καρκίνος είναι μια απειλητική για τη ζωή ασθένεια που κατέχει μια από τις πρώτες θέσεις των αιτιών θανάτου τις τελευταίες δεκαετίες. Η ανάγκη ανάπτυξης νέων μεθόδων διάγνωσης και θεραπείας του είναι πλέον αδήριτη. Οι ήδη υπάρχουσες θεραπείες χρήζουν βελτίωσης αφού οι παρενέργειες οδηγούν σε εξασθένηση του οργανισμού. Οι νέες μέθοδοι διάγνωσης και θεραπείας θα πρέπει να είναι εκλεκτικές ως προς τα καρκινικά κύτταρα ώστε κατά το δυνατόν να μην προσβάλλονται τα υγιή κύτταρα. Η έρευνα ως προς την κατανόηση των καρκινικών κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος του όγκου έχει δώσει σημαντικά στοιχεία στους ερευνητές ώστε να αναπτυχθούν νέα μόρια που να αφορούν κυρίως τα καρκινικά κύτταρα. Στόχος, λοιπόν, της εργασίας αυτής είναι η μελέτη του καρκινικού μεταβολισμού και του μικροπεριβάλλοντος του όγκου με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη νέων χρωμοφόρων μορίων που να διαθέτουν στοιχεία που στοχεύουν ειδικά τα καρκινικά κύτταρα και ειδικούς φθοροφόρους στο εγγύς υπέρυθρο ιχνηθέτες που ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα που εντοπίζονται σε όγκους. Το καινοτόμο στοιχείο της εργασίας είναι η ανάπτυξη χρωστικών που να οδηγούν σε απεικόνιση και χαρτογράφηση των καρκινικών κυττάρων μέσω του φθορισμού, ενώ ταυτόχρονα μπορούν να αποβούν κυτταροτοξικές επιλεκτικά

μετά από ακτινοβολήση σε κατάλληλο μήκος κύματος στην περιοχή του εγγύς υπέρυθρου, παράγοντας κυτταροτοξικές ρίζες οξυγόνου σε απλή κατάσταση. Πράγματι συνθέσαμε μια καινοτόμα διαγνωστική και τέσσερις θεραπευτικές ενώσεις που να ικανοποιούν τα παραπάνω χαρακτηριστικά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά και μέθοδοι

Όλα τα εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Τα ευαίσθητα στον ατμοσφαιρικό αέρα και την υγρασία αντιδραστήρια σε υγρή μορφή μεταφέρθηκαν μέσω σύριγγας. Οι οργανικοί πτητικοί διαλύτες απομακρύνθηκαν από τα διαλύματα μέσω περιστροφικού εξατμιστήρα υπό κενό στην κατάλληλη θερμοκρασία. Οι μη πτητικοί διαλύτες απομακρύνθηκαν με λυοφιλοποίηση του υλικού στα 0.1 mbar, 25°C για 48 ώρες. Πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης flash με πυριτική γέλη Acros Organics 60 (230-400 mesh). Πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin layer chromatography, TLC) με προεπικαλυμμένες πλάκες Merck silica gel 60 F254. Οι πλάκες TLC οπτικοποιήθηκαν με έκθεση σε υπεριώδες φως (UV) και/ή βύθιση σε υδατικό διάλυμα υπερμαγγανικού καλίου ($\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4\text{H}$). Η β-γαλακτοσιδάση από τον *Aspergillus oryzae* αγοράστηκε από τη Sigma Aldrich.

Φασματοσκοπία NMR

Τα φάσματα ^1H NMR καταγράφηκαν σε φασματόμετρο Bruker Avance FT-NMR 400 MHz ή 500 MHz. Το πρόγραμμα Topspin 2.1 χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του συστήματος NMR. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να αναφέρω ότι στην παρούσα διατριβή δεν χρησιμοποιείται η συστηματική κατά IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) αρίθμηση για λόγους απλούστευσης.

Φασματοσκοπία UV-Vis

Τα φάσματα UV-Vis καταγράφηκαν με φασματοφωτόμετρο Edinburg D5S σε κυψελίδα χαλαζία 1 cm σε κατάλληλες σταθερές θερμοκρασίες (π.χ., μετρήσεις παρουσία ενζύμου στους 37 °C). Τυπικά πειράματα τιτλοδότησης πραγματοποιήθηκαν με διαδοχικές προσθήκες του αναλύτη στο ίδιο διάλυμα δείγματος 3 mL (10,0 μM) σε κυψελίδα χαλαζία.

Φασματοσκοπία φθορισμού

Τα φάσματα φθορισμού καταγράφηκαν με Edinburg F5S σε κυψελίδα χαλαζία 1 cm σε κατάλληλες σταθερές θερμοκρασίες. Τυπικά πειράματα τιτλοδότησης πραγματοποιήθηκαν με διαδοχικές προσθήκες αναλύτη στο ίδιο διάλυμα δείγματος 3 mL (10,0 μM) σε κυψελίδα χαλαζία.

Όριο ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης προσδιορίστηκε από τα δεδομένα τιτλοδότησης φθορισμού με βάση αναφερόμενες μεθόδους [100, 101] Τα φάσματα φθορισμού των ενώσεων μετρήθηκαν πέντε φορές και εξήχθη η τυπική απόκλιση από της τυφλού μέτρησης. Το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε με την ακόλουθη εξίσωση: $\text{LOD} = 3 \cdot \sigma/k$, όπου σ είναι η τυπική απόκλιση της τυφλού μέτρησης και k είναι η κλίση μεταξύ της έντασης φθορισμού έναντι της συγκέντρωσης της αναλυόμενης ουσίας.

Φασματομετρία Μάζης

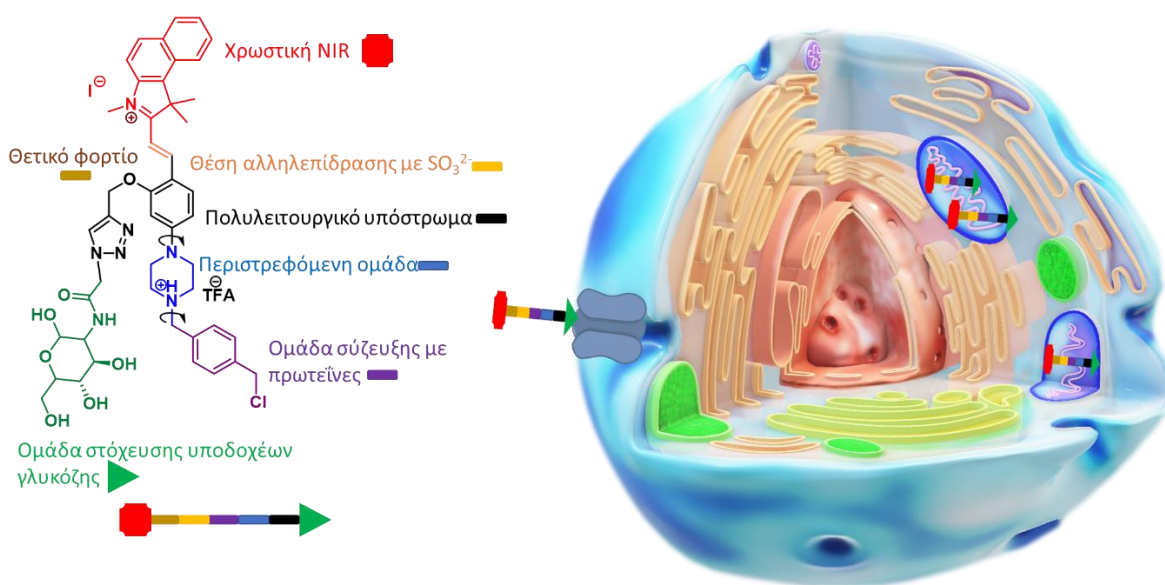
Τα φάσματα μάζης λήφθηκαν σε φασματόμετρο μάζας Xevo G2 Q-TOF, όπου χρησιμοποιήθηκε σε λειτουργία θετικού ESI (Ιονισμός Ηλεκτροψεκασμού, ElectroSpray Ionization) για άμεση λήψη έγχυσης με χρήση πλήρους σάρωσης MS σε εύρος σάρωσης μάζας 50–1200 m/z. Τυπικές συνθήκες πηγής για τη μέγιστη ένταση των ιόντων ήταν οι εξής: τριχοειδής τάση 3,0 kV; δείγμα κώνου 40 V; θερμοκρασία πηγής 120 °C; θερμοκρασία αποδιάλυσης 550 °C; ταχύτητα ροής αερίου κώνου 100 L h⁻¹; ταχύτητα ροής αερίου αποδιάλυσης (N_2) 600 L h⁻¹.

2.2 Σχεδιασμός, σύνθεση και αξιολόγηση διαγνωστικής ένωσης που στοχεύει τα καρκινικά κύτταρα μέσω υποδοχέων γλυκόζης, της οποίας ο φθορισμός ανταποκρίνεται σε μεταβολές του ιζώδους.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το ιζώδες είναι μια φυσικοχημική παράμετρος που χαρακτηρίζει τα κύτταρα και τα υποκυτταρικά οργάνidia κάθε οργανισμού. Μεταβολές στην φυσιολογική τιμή του ιζώδους και συγκεκριμένα αύξηση, μπορεί να αποκαλύπτουν παθολογίες, όπως ο καρκίνος. Με στόχο λοιπόν την ανίχνευση αυτών των μεταβολών σχεδιάσαμε μία φθορίζουσα ένωση, η οποία φέρει ως χρωμοφόρο πυρήνα την ομάδα της ημικυανίνης και μπορεί να ανταποκρίνεται στις μεταβολές του ιζώδους [2, 3]. Παράλληλα η ένωση δύναται να παρακολουθεί τη δράση της οξειδάσης θειώδους, αφού αλληλεπιδρά με θειώδη που αποτελούν υπόστρωμα του ενζύμου. Η οξειδάση θειώδους υπερεκφράζεται σε συγκεκριμένους καρκίνους, υποδεικνύοντας παθολογία. Τέλος, η ένωση αυτή στοχεύει τα μιτοχόνδρια των καρκινικών κυττάρων, καθώς στο συγκεκριμένο οργάνidio εντοπίζεται το προς μελέτη ένζυμο, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται σημαντική αύξηση στο ιζώδες λόγω υπερέκφρασης πρωτεϊνών. Η διαγνωστική ένωση όταν δεν αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες επιδιαλυτώνεται από μόρια νερού. Όταν όμως λάβει χώρα αλληλεπίδραση της διαγνωστικής ένωσης με την πρωτεΐνη στόχο, τα μόρια νερού απομακρύνονται αυξάνοντας το τοπικό ιζώδες. Για το σκοπό αυτό στη δομή της διαγνωστικής ένωσης έχει προσαρτηθεί μια ομάδα που αλληλοεπιδρά με ομοιοπολικό τρόπο με βιομόρια.

Αναλυτικότερα η νέα διαγνωστική ένωση διαθέτει τα εξής τμήματα:

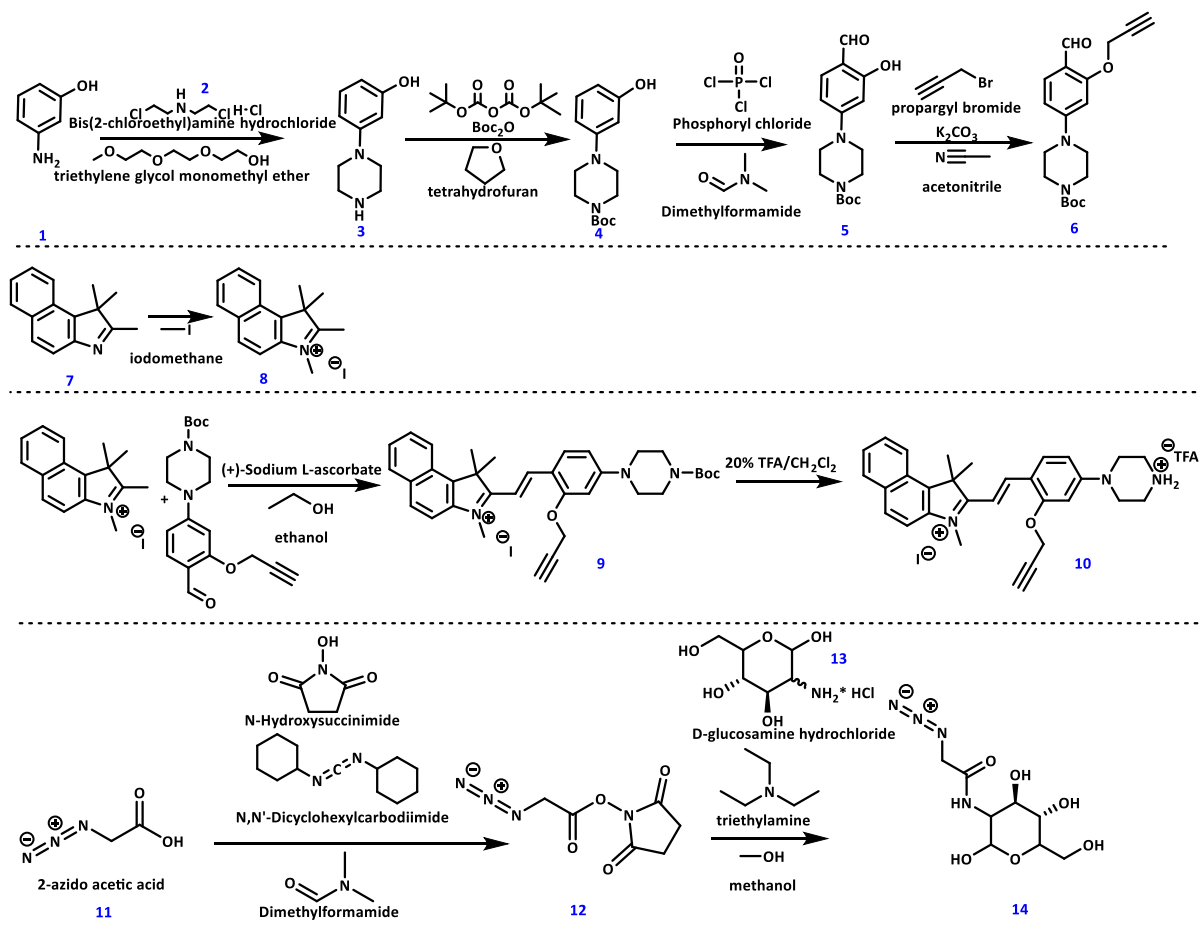
1. φθοροφόρο σκελετό ημικυανίνης, που εκπέμπει στην περιοχή του εγγύς υπέρυθρου,
2. ομάδα που ανταποκρίνεται στις μεταβολές του ιζώδους,
3. ομάδα που στοχεύει υποδοχείς γλυκόζης, μέσω των οποίων δύναται να ενδοκυττώνεται και να συσσωρεύεται στα καρκινικά κύτταρα λόγω των μεγαλύτερων αναγκών τους σε γλυκόζη,
4. θετικό φορτίο που κατευθύνει την ένωση στα μιτοχόνδρια, λόγω του αρνητικού δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης,
5. ομάδα που ανιχνεύει θειώδη και μπορεί να υποβοηθήσει στη μελέτη της δράσης του μιτοχονδριακού ενζύμου, οξειδάση θειώδους,
6. και τέλος ομάδα που συζευγνύεται ομοιοπολικά με πρωτεΐνες

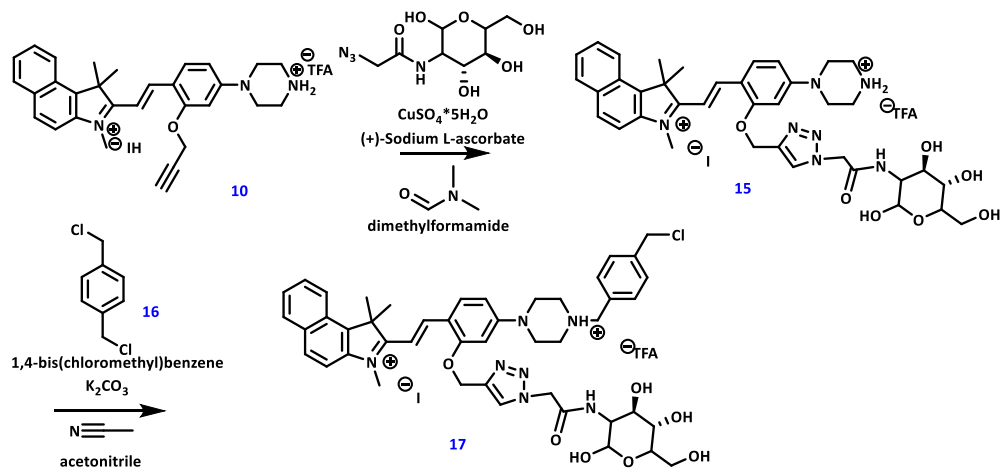


Εικόνα 32: Σχηματική αναπαράσταση των δομικών στοιχείων και του προτεινόμενου τρόπου δράσης της διαγνωστικής ένωσης 17 που σχεδιάσαμε.

2.2.1 Συνθετική πορεία της διαγνωστικής ένωσης 17

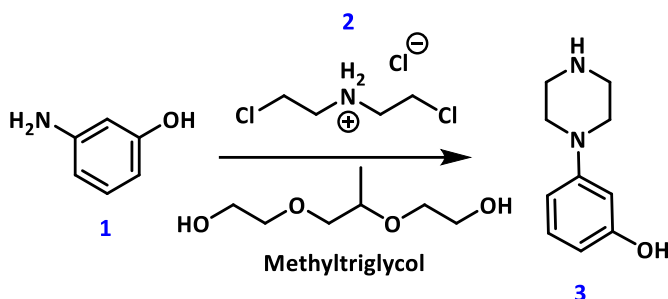
Αρχικά πραγματοποιήθηκε σύνθεση ενός πολυλειτουργικού υποστρώματος (ένωση **6**), το οποίο φέρει στο σκελετό του ταυτόχρονα: i) μια αλδεΐδη που επιτρέπει την ενσωμάτωση κάποιου παράγοντα απεικόνισης, μέσω συμπύκνωσης Knoevenagel [102] ii) μια ομάδα τελικού αλκινίου, που επιτρέπει τη σύζευξη με μόρια στόχευσης του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος μέσω click χημείας καταλυόμενης από χαλκό (Huisgen Reaction [103]) και iii) έναν πιπεραζινικό δακτύλιο, ο οποίος ανταποκρίνεται στο ιζώδες [104]. Σε ένα πρώτο βήμα, ακολούθησε η συμπύκνωση μεταξύ του χρωμοφόρου τμήματος, και του νέου πολυλειτουργικού υποστρώματος, ώστε να προκύψει η χρωστική ένωση **10**. Στη συνέχεια προκειμένου οι διαγνωστικές ενώσεις να ανταποκρίνονται στο μικροπεριβάλλον του καρκινικού κυττάρου και πιο συγκεκριμένα στο αυξημένο ιζώδες, πραγματοποιήθηκε μια αντίδραση υποκατάστασης S_N2 στο πιπεραζινικό δακτύλιο της ένωσης **17**, ώστε να εισαχθεί μια δραστική ομάδα που αφενός περιορίζει την περιστροφή του πιπεραζινικού δακτυλίου και αφετέρου επιτρέπει την ομοιοπολική σύνδεση με βιομόρια, όπως πρωτεΐνες που φέρουν ελεύθερες υδροξυλομάδες και σουλφυδριλομάδες, λόγω της παρουσίας του χλωρίου. Τέλος, πραγματοποιήθηκε 1,3 κυκλοπροσθήκη, καταλυόμενη από χαλκό, μεταξύ αυτής της χρωστικής και της ομάδας στόχευσης.





Εικόνα 33: Πειραματική πορεία σύνθεσης της διαγνωστικής ένωσης 17

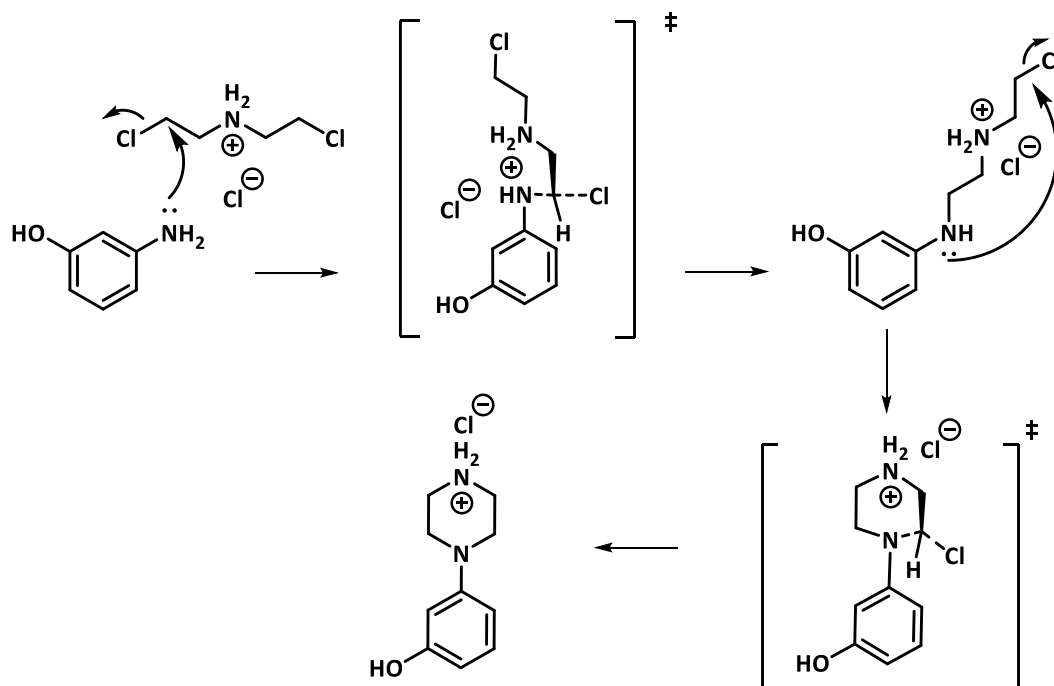
Σύνθεση της ένωσης 3



Εικόνα 34: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 3 [4-7].

Σε ένα διάλυμα υδροχλωρικής δις - (2-χλωροαιθυλο) αμίνης (1.78 g, 9.988 mmol) σε άνυδρο μονομεθυλαιθέρα τριαυθενολγλυκόλης (4 ml), προστέθηκε 3-άμινο-φαινόλη (545 mg, 4.994 mmol) και το αναδευόμενο υπό ατμόσφαιρα αζώτου μίγμα της αντίδρασης, θερμάνθηκε με αναρροή στους 140 °C για 15 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με TLC χρωματογραφία με σύστημα διαλυτών 5% μεθανόλη/ διχλωρομεθάνιο (MeOH/CH₂Cl₂), v/v. Αφού το μίγμα της αντίδρασης ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκε οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc, 150 mL) και το μίγμα που προκύπτει, εκχυλίστηκε δύο φορές με διάλυμα 1N NaOH (pH 10, 2*40 mL). Η οργανική στοιβάδα ξηράθηκε με άνυδρο Na₂SO₄, διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε υπό υψηλό κενό όπου οδήγησε στο να ληφθεί ένα καφέ στερεό (481 mg, 54 %).

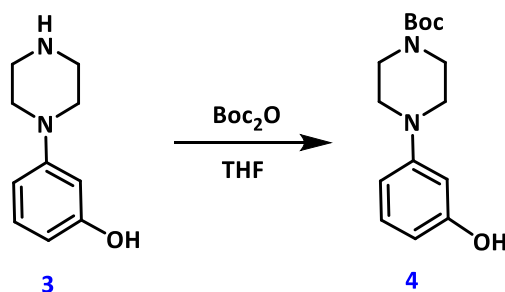
Μηχανιστικά η αντίδραση αυτή αποτελείται από μία διαμοριακή αντίδραση S_N2 υποκατάστασης μεταξύ της 3-άμινο φαινόλης και ενός μορίου υδροχλωρικής δις - (2-χλωροαιθυλο) αμίνης όπου σχηματίζεται μία ενδιάμεση ένωση. Ακολουθεί ένα δεύτερο βήμα μιας ενδομοριακής αντίδρασης S_N2 υποκατάστασης όπου λαμβάνεται τελικά η ένωση 3.



Εικόνα 35: Προτεινόμενος μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης 3.

Ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **3** μέσω φασματοσκοπίας NMR παρατίθεται στο παράρτημα του κειμένου.

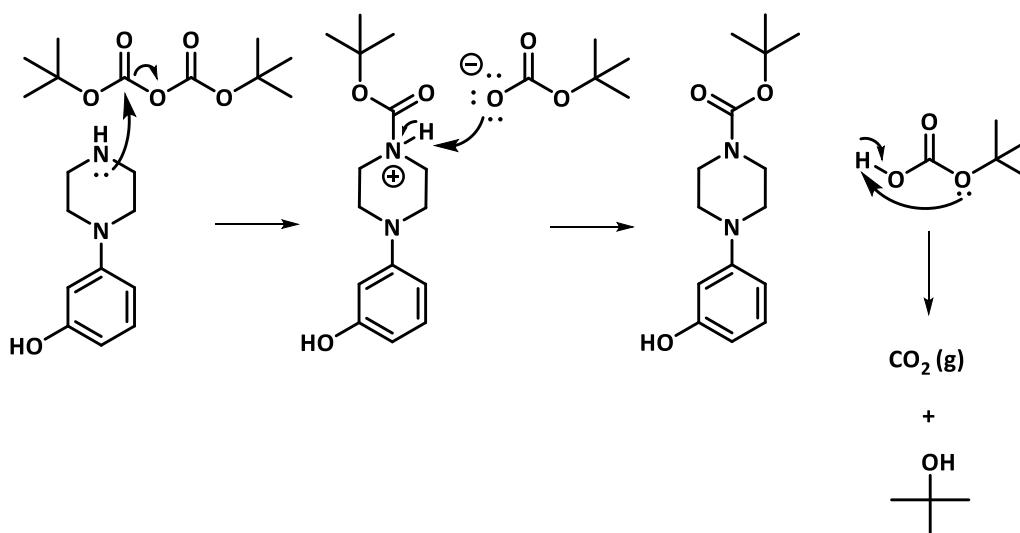
Σύνθεση της ένωσης 4



Εικόνα 36: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 4 [7].

Σε ένα διάλυμα της ένωσης **3** (293.8 mg, 1.65 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (Tetrahydrofuran, THF) (20mL), προστέθηκε σταγονομετρικά ένα διάλυμα Boc_2O (356 mg, 1.65 mmol) σε THF (20 mL) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με TLC χρωματογραφία με σύστημα διαλυτών 5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, v/v. Στη συνέχεια προστέθηκε οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) (150 mL) και το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίστηκε δύο φορές με H_2O (2*50 mL). Η οργανική στοιβάδα συλλέχθηκε και ξηράθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 , διηθήθηκε, συμπυκνώθηκε υπό υψηλό κενό και κατεργάστηκε με εξάνιο (Hex) ώστε να παραλάβουμε το επιθυμητό προϊόν σαν υποκίτρινο στερεό (234 mg, 51 %).

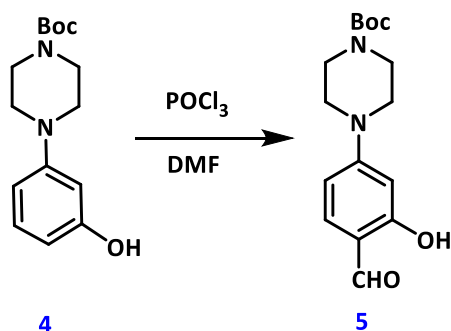
Η αντίδραση αυτή περιγράφει την εκλεκτική προστασία της αμινομάδας του πιπεραζινικού δακτυλίου χρησιμοποιώντας την προστατευτική ομάδα Boc. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο γιατί η επόμενη αντίδραση που ακολουθεί χωρίς την προστασία θα οδηγούσε σε παραπροϊόν ιμίνης, μετά από αντίδραση της προκύπτουσας αλδεϋδομάδας με την αμινομάδα ενός δεύτερου μορίου. Ο μηχανισμός της αντίδρασης φαίνεται στην παρακάτω **Εικόνα 37**.



Εικόνα 37: Προτεινόμενος μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης 4.

Ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **4** μέσω φασματοσκοπίας NMR παρατίθεται στο παράρτημα του κειμένου.

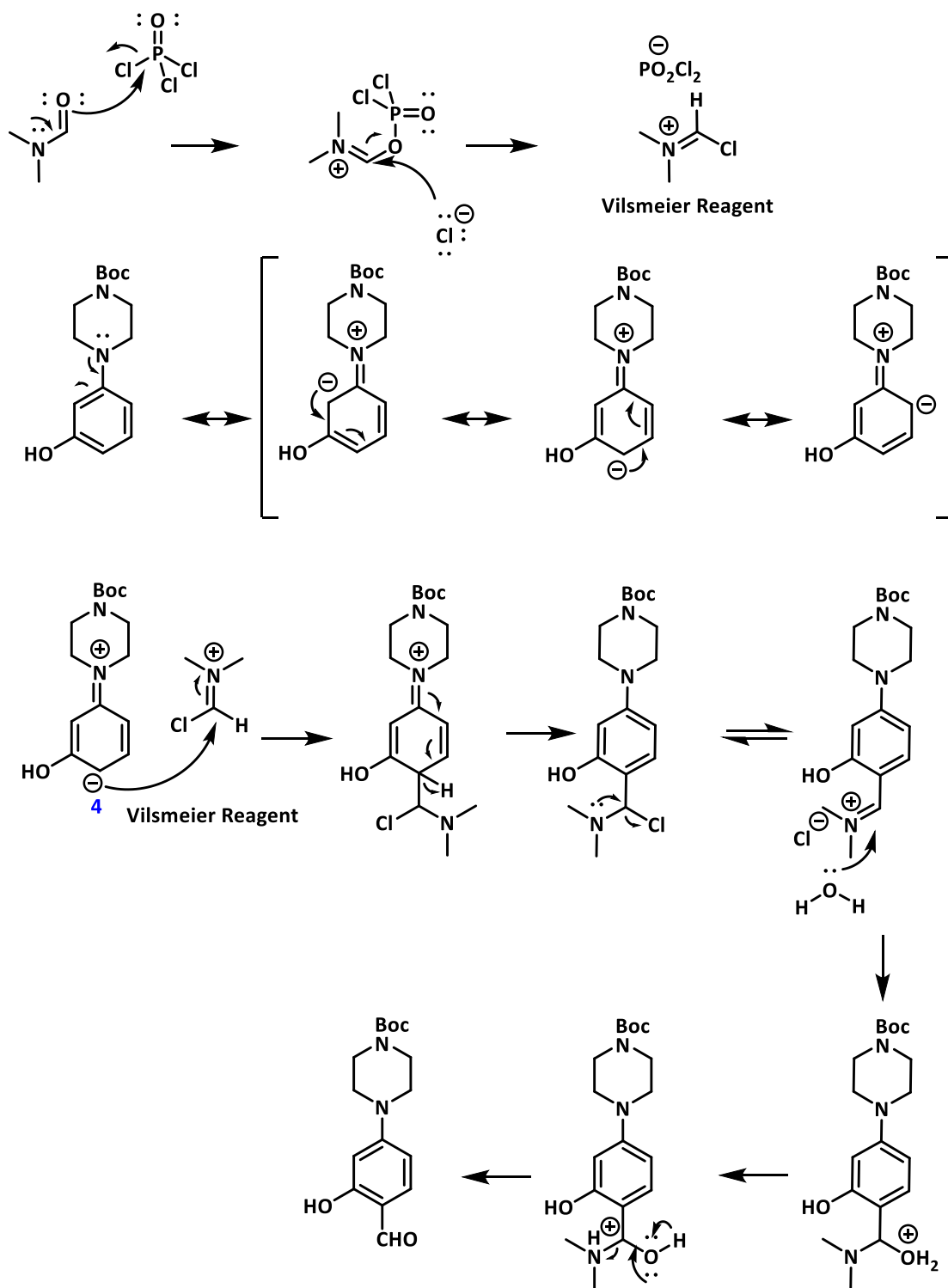
Σύνθεση της ένωσης 5



Εικόνα 38: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 5 [8].

Σε ένα παγωμένο διάλυμα της ένωσης **4** (234 mg, 0.8406 mmol) σε άνυδρο N,N διμεθυλοφορμαμίδιο (dimethylformamide, DMF) (5 mL) προστέθηκε σταγονομετρικά ένα διάλυμα οξυχλωριούχου φωσφόρου (93.5 μ L, 0.76 mmol) σε άνυδρο DMF (1 mL) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με TLC χρωματογραφία με σύστημα διαλυτών 5% MeOH/CH₂Cl₂, v/v. Ακολούθησε απόχυση σε πάγο και στη συνέχεια το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε σε pH 8 χρησιμοποιώντας κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου. Στη συνέχεια προστέθηκε EtOAc (50 mL) και το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίστηκε δύο φορές με H₂O (2*100 mL). Η οργανική στοιβάδα ξηράθηκε με άνυδρο Na₂SO₄, διηθήθηκε, συμπυκνώθηκε υπό υψηλό κενό και υποβλήθηκε σε καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης (20% EtOAc / Hex) για να παραλάβουμε ένα υποκίτρινο στερεό (77 mg, 30 %).

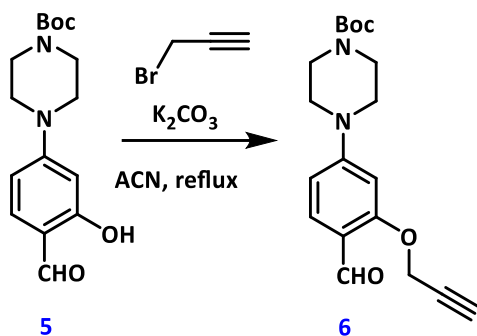
Σε αυτό το σημείο πραγματοποιείται φορμυλίωση μέσω αντίδρασης Vilsmeier–Haack ώστε να παραλάβουμε την ένωση **5**. Με βάση τον προτεινόμενο μηχανισμό της αντίδρασης, αρχικά λαμβάνει χώρα *in situ* σχηματισμός του αντιδραστήριου Vilsmeier–Haack, το οποίο στη συνέχεια πραγματοποιεί αντίδραση ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης με την ένωση **4**. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό του ενδιαμέσου προϊόντος α-χλωρο αμίνης, η οποία κατόπιν κατεργασίας με νερό μετασχηματίζεται στην επιθυμητή ένωση **5**.



Εικόνα 39: Προτεινόμενος μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης 5.

Ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης 5 μέσω φασματοσκοπίας NMR παρατίθεται στο παράρτημα του κειμένου.

Σύνθεση της ένωσης 6

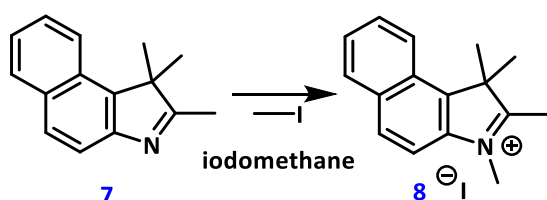


Εικόνα 40: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 6 [9].

Σε διάλυμα της ένωσης **5** (77 mg, 0.25134 mmol) και άνυδρου ανθρακικού καλίου (69 mg, 0.50267 mmol), σε άνυδρο MeCN (15 mL) προστέθηκε σταγονομετρικά προπαργυλοβρωμίδιο (24.7 μ L, 0.276474 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης θερμάνθηκε και παρέμεινε σε αναρροή για 15 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολούθηθηκε με TLC χρωματογραφία σε σύστημα διαλυτών 30% EtOAc / Hex, v/v. Αφού η αντίδραση ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, στο μίγμα της αντίδρασης προστέθηκε νερό (100 mL) και ακολούθησε εκχύλιση με EtOAc (2*50 mL). Στη συνέχεια η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 , διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε με εξάτμιση υπό υψηλό κενό. Στη συνέχεια ακολούθησε χρωματογραφία στήλης (20% EtOAc / Hex) όπου λάβαμε την επιθυμητή ένωση ως ένα καφέ στερεό (73.6 mg, 85%).

Η αντίδραση αυτή περιγράφει μία αντίδραση $\text{S}_{\text{N}}2$ υποκατάστασης, προκειμένου να εισάγουμε ομάδα τελικού αλκινίου στην ένωση. Η ένωση **6** απομονώθηκε σαν καφέ στερεό και η συνολική απόδοση της σύνθεσης ήταν ~7 %. Ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **6** μέσω φασματοσκοπίας NMR παρατίθεται στο παράρτημα του κειμένου.

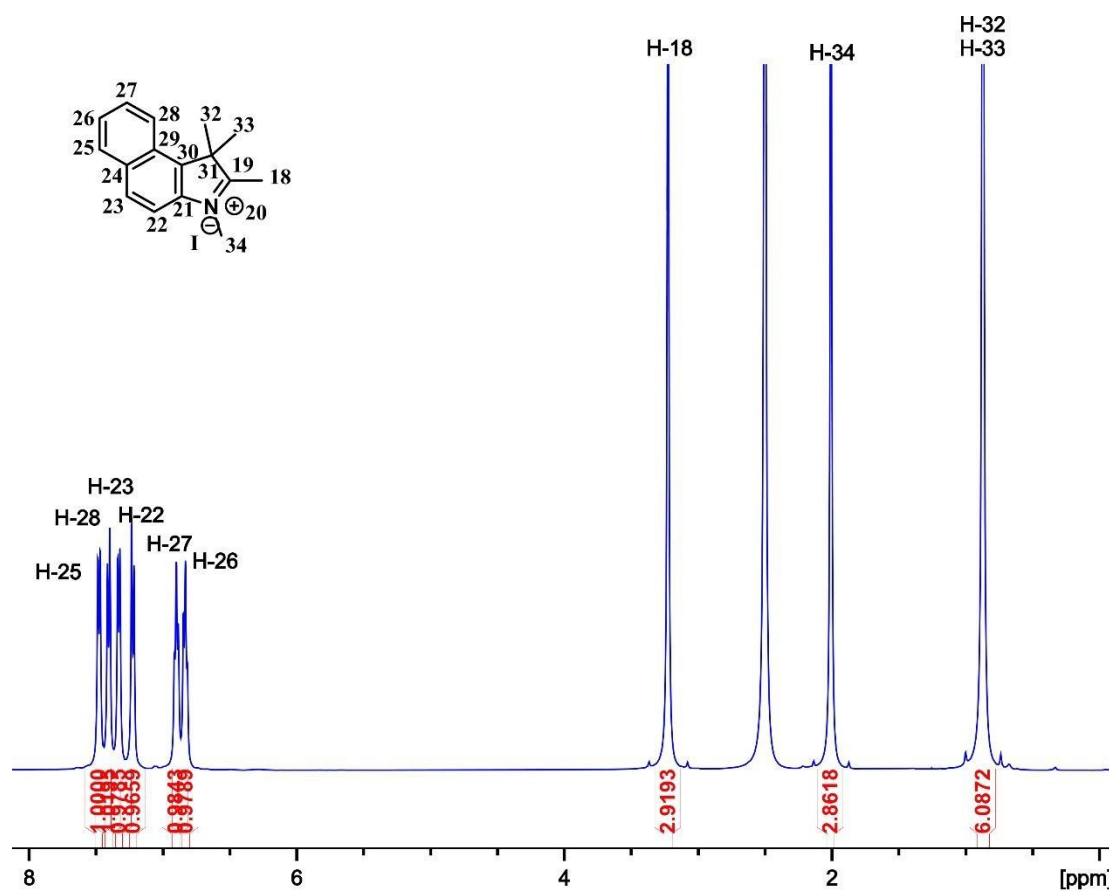
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 8



Εικόνα 41: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 8 [10].

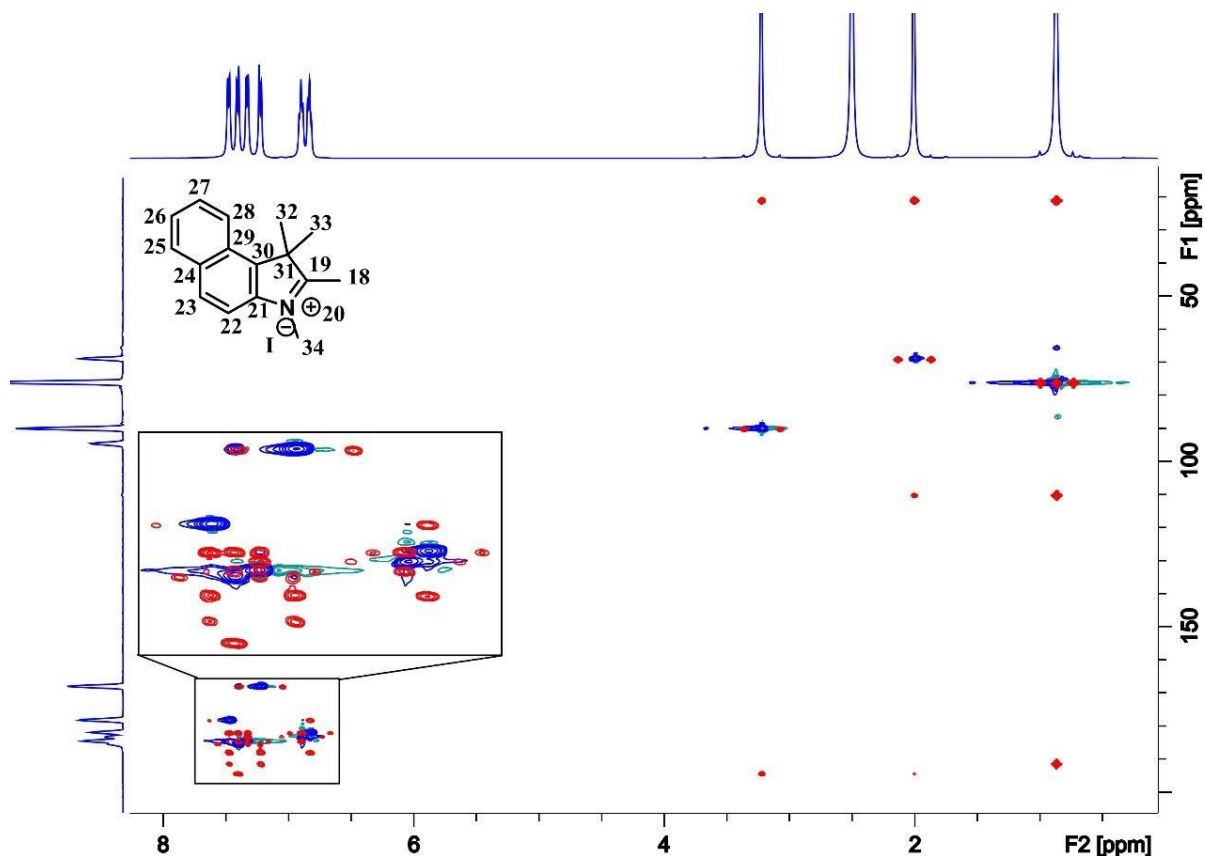
Σε μία σφαιρική φιάλη που περιέχει 1,1,2-τριμεθυλ-1H-βενζοϊνδόλιο (1gr, 4,8 mmol) προστίθεται άνυδρο ιωδομεθάνιο (1,18 mL, 19 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 ώρες. Στη συνέχεια το προκύπτον μίγμα εκπλένεται με Hex (3*10 mL), ώστε να δώσει τελικά ένα γκρι προϊόν (1,4 mg, 84%).

Εδώ λαμβάνει χώρα μία αντίδραση αλκυλίωσης, πιο συγκεκριμένα μεθυλίωσης, παρουσία ιωδομεθανίου. Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **8** μέσω φασματοσκοπίας NMR. Η αρίθμηση της ένωσης ξεκινάει από το νούμερο μεγαλύτερο του ενός (πιο συγκεκριμένα το 18) ώστε να διατηρηθεί κατά το δυνατόν ίδια καθ' όλη την πορεία της σύνθεσης-ώστε π.χ., το πρωτόνιο 27 να είναι το ίδιο σε κάθε στάδιο της σύνθεσης.



Εικόνα 42:Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης 8 σε DMSO-d₆ (500 MHz, 25 °C).

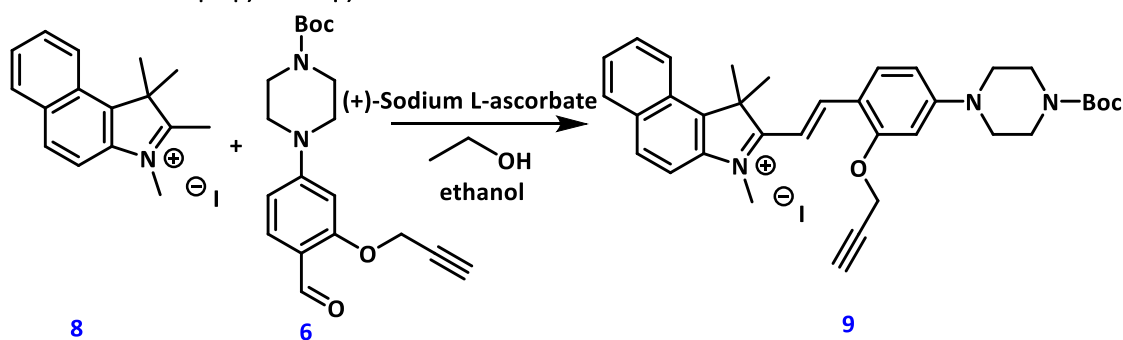
¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 7.5-7.45 (d, J=8.15 Hz, 1H, H-25), 7.43-7.38 (d, J= 8.56 Hz, 1H, H-28), 7.36-7.29 (d, J=8.15 Hz, 1H, H-23), 7.26-7.20 (d, J=8.56 Hz, 1H, H-22), 6.93-6.87 (t, J=7.51 Hz, 1H, H-27), 6.86-6.80 (t, J= 7.07 Hz 1H, H-26), 3.26-3.19 (s, 3H, H-18), 2.07-1.95 (s, 3H, H-34) 0.95-0.81 (s, 6H, H-32 & H-33).



Εικόνα 43: Υπέρθυση φασμάτων 2D ^1H - ^{13}C HSQC (μπλε) -H-MBC (κόκκινο) της ένωσης 8 σε DMSO-d_6 (500 MHz, 25 °C).

^{13}C NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ : 189.1 (C-19), 140.7 (C-30), 137.05 (C-29), 133.2 (C-24), 130.9 (C-21), 130.7 (C-28), 129.9 (C-23), 128.7 (C-27), 127.26 (C-26), 123.7 (C-25), 113.6 (C-22), 55.8 (C-31), 35.6 (C-18), 21.6 (C-32 & C-33), 14.3 (C-34).

Σύνθεση της ένωσης 9

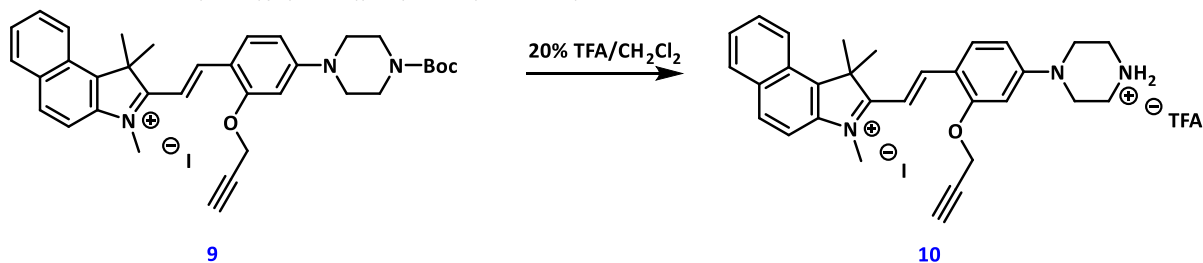


Εικόνα 44: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 9 [11].

Σε διάλυμα της ένωσης 6 (50 mg, 0.152 mmol) και της ένωσης 8 (53 mg, 0.152 mmol), σε αιθανόλη (4 mL) προστέθηκε ασκορβικό νάτριο [(+)-Sodium L-ascorbate, 35,75 mg, 0.436 mmol] και το μίγμα της αντίδρασης θερμάνθηκε με αναρροή για 4 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολούθηθηκε με TLC χρωματογραφία με σύστημα διαλυτών 5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, v/v. Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό υψηλό κενό και το μίγμα της αντίδρασης υποβλήθηκε σε καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης (3% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) ώστε να λάβουμε το επιθυμητό προϊόν σαν κόκκινο στερεό (99,3 mg, 96,4 %).

Το βήμα αυτό της συνθετικής πορείας είναι η αντίδραση συμπύκνωσης, η οποία καταλύεται από την παρουσία βάσης ((+)-Sodium L-ascorbate), μέσω του μηχανισμού Knoevenagel, της ένωσης **6** με την ένωση **8** προκειμένου να σχηματιστεί η α, β ακόρεστη ένωση **9**. Η χρωστική **9** φέρει δυο διαφορετικές λειτουργικές ομάδες, επιτρέποντας μεταγενέστερη τροποποίηση στο σκελετό της ένωσης, ένα τελικό αλκίνιο και έναν πιπεραζινικό δακτύλιο. Το τελικό αλκίνιο επιτρέπει τη σύζευξη μέσω αντίδρασης κυκλοπροσθήκης CuAAC με διάφορα ογκοστοχευτικά μόρια που φέρουν ομάδα αζίδου κατευθύνοντας το μόριο μας στο επιθυμητό περιβάλλον. Όσον αφορά τον πιπεραζινικό δακτύλιο, η παρουσία της δευτεροταγούς αμινομάδας επιτρέπει τη σύζευξη αφενός με διάφορους ιχνηθέτες οι οποίοι ανιχνεύουν τους βιοδείκτες που υπερεκφράζονται στο μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων και αφετέρου λειτουργικών ομάδων που επιτρέπουν τη σύζευξη με βιοδραστικά μόρια όπως οι πρωτεΐνες που φέρουν ελεύθερες σουλφυδριλομάδες μέσω ομοιοπολικού δεσμού. Θα πρέπει να τονιστεί ότι κρίθηκε απαραίτητο σε αυτό το στάδιο της συνθετικής πορείας η διατήρηση της προστατευτικής ομάδας Boc στο άζωτο της δευτεροταγούς αμινομάδας λόγω του πιθανού σχηματισμού βάσης Schiff με την καρβονυλομάδα της ένωσης **6**.

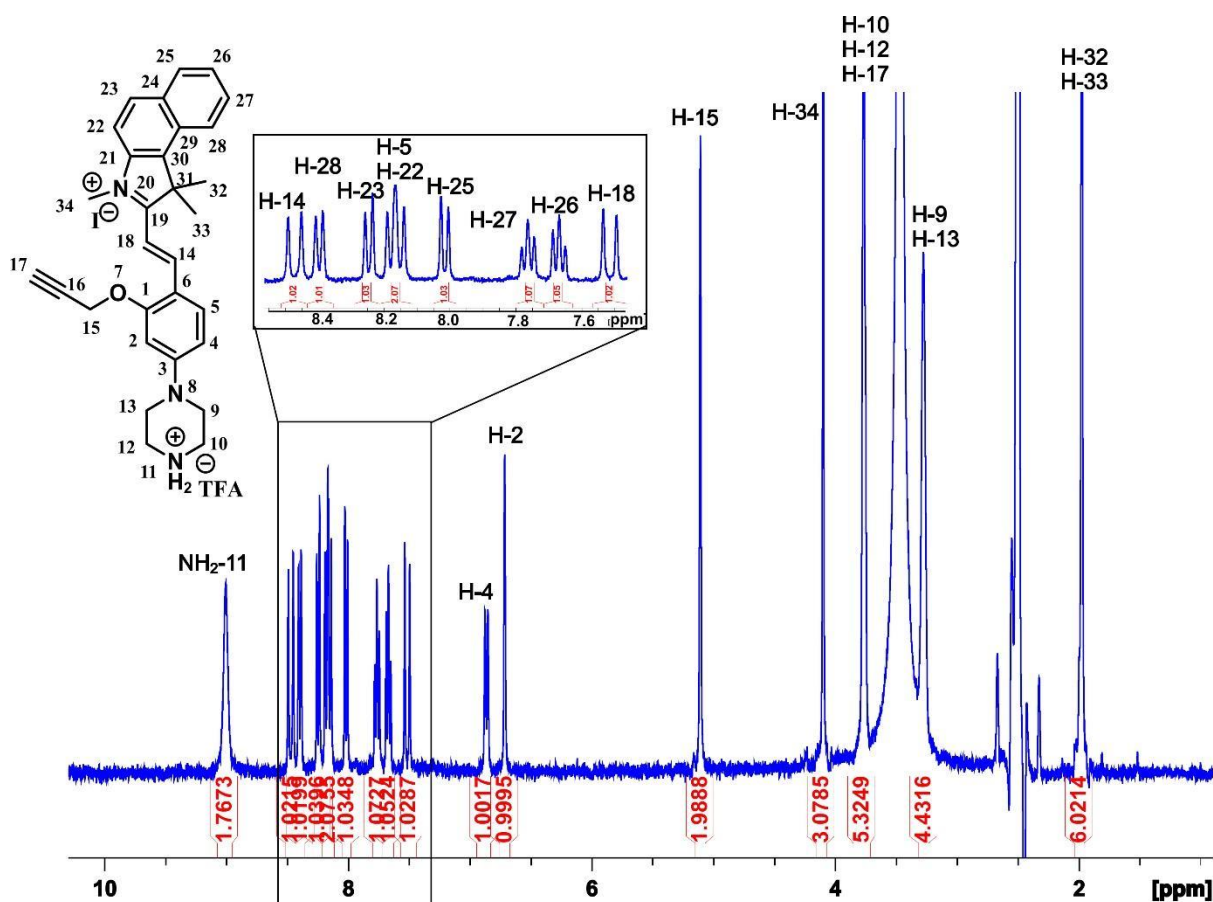
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 10



Εικόνα 45: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 10.

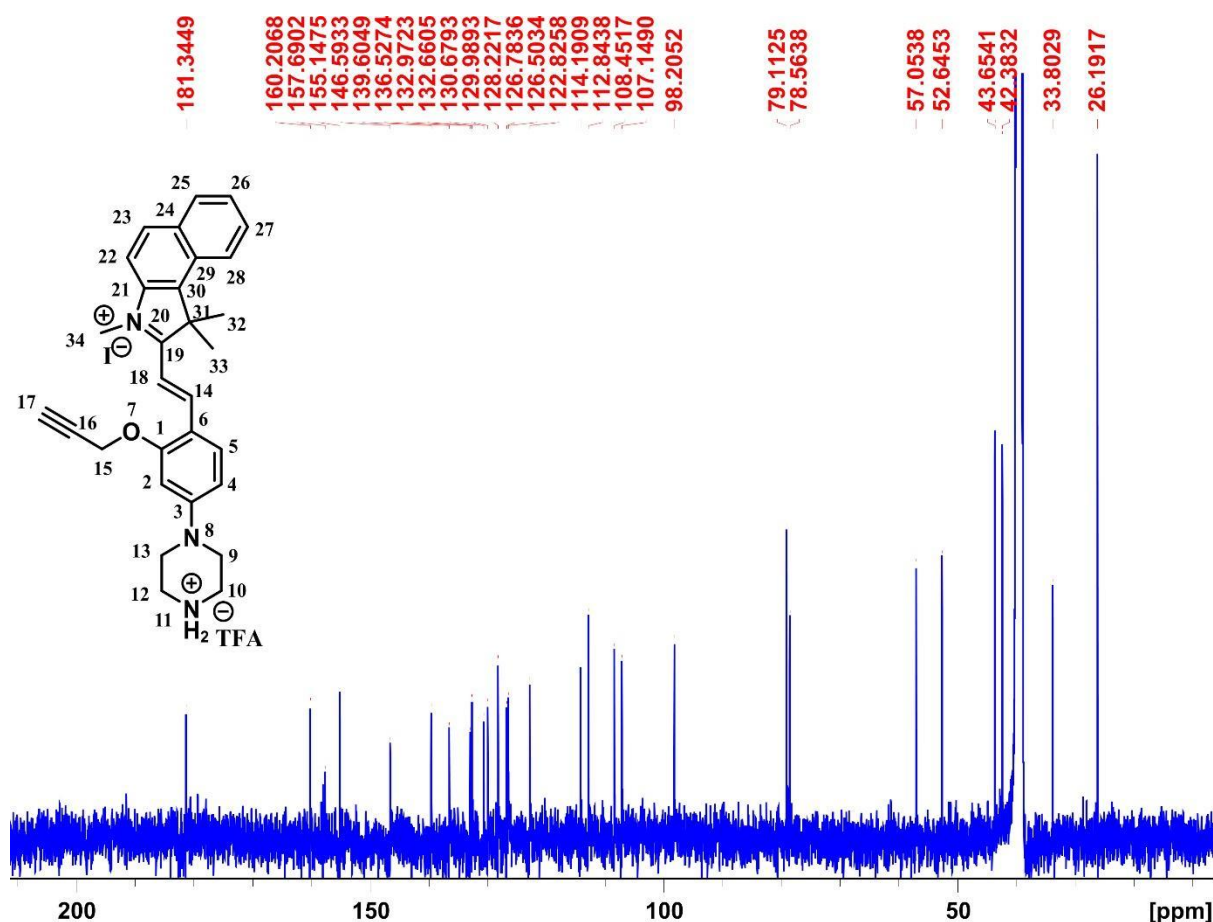
Σε ένα παγωμένο διάλυμα της ένωσης **9** (99.3 mg, 0.15 mmol) σε CH_2Cl_2 (8 mL), προστέθηκε σταγονομετρικά τριφθοροοξικό οξύ (2 mL) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με TLC χρωματογραφία με σύστημα διαλυτών 5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, v/v. Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό υψηλό κενό και το ακατέργαστο προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) ώστε να λάβουμε το επιθυμητό προϊόν σαν κόκκινο στερεό (94.7 mg, 95%).

Η αντίδραση αυτή περιγράφει την αποπροστασία του πιπεραζινικού δακτυλίου με απομάκρυνση της ομάδας BOC ως CO_2 και του τριτοταγούς καρβοκατιόντος της ισοπροπυλικής ομάδας. Ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **10** μέσω φασματοσκοπίας NMR παρατίθεται στο παράρτημα του κειμένου.



Εικόνα 46: Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης 10 σε DMSO-d₆ (400 MHz, 25 °C).

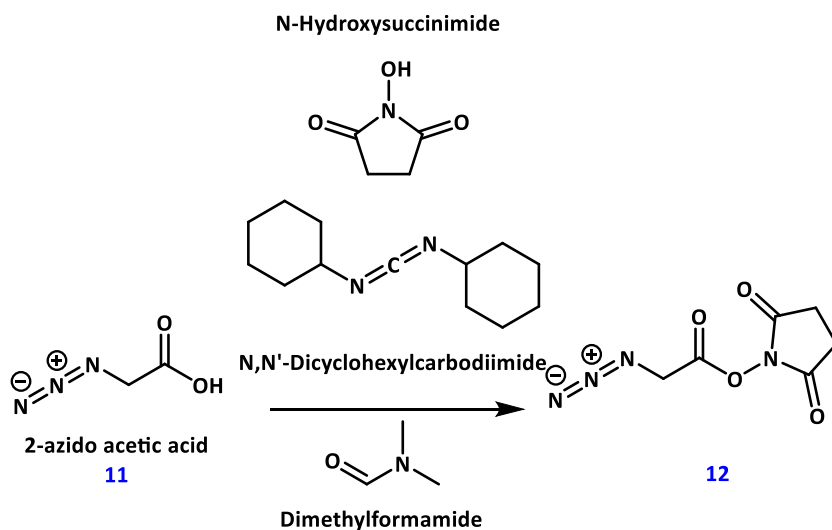
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 9.07-8.96 (br, 2H, NH₂-11), 8.51-8.45 (d, J= 16 Hz, 1H, H-14), 8.42-8.38 (d, J=8.5 Hz, 1H, H-28), 8.27-8.23 (d, J=8.8 Hz, 1H, H-23), 8.21-8.14 (m, 2H, H-5 & H-22), 8.04-8.00 (d, J= 8.8 Hz, 1H, H-25), 7.79-7.74 (t, J=7.42 Hz, 1H, H-27), 7.70-7.65 (t, J=7.42 Hz, 1H, H-26) 7.55-7.49 (d, J=16 Hz, 1H, H-18), 6.89-6.85 (d, J=8.1 Hz, 1H, H-4), 6.75-6.70 (s, 1H, H-2), 5.13-5.10 (s, 2H, H-15), 4.11-4.10 (s, 3H, H-34), 3.80-3.74 (m, 5H, H-10, H-12 & H-17), 3.32-3.25 (br, 4H, H-9 & H-13), 1.99-1.97 (s, 6H, H-32 & H-33).



Εικόνα 47: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 10 σε DMSO-d₆ (100 MHz, 25 °C).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 181.4 (C-19), 160.2 (C-1), 155.2 (C-3), 146.6 (C-29), 139.6 (C-14), 136.5 (C-30), 133.0 (C-24 & C-5), 132.7 (C-23), 130.7 (C-21), 130.0 (C-28), 128.2 (C-22), 126.8 (C-27), 126.5 (C-26), 122.8 (C-25), 114.2 (C-6), 112.8 (C-18), 108.5 (C-), 107.2 (C-4), 98.2 (C-2), 79.1 (C-16), 78.6 (C-17), 57.1 (C-15), 52.6 (C-31), 43.6 (C-9 & C-13), 42.4 (C-10 & C-12), 33.8 (C-34), 26.19 (C-32 & C-33).

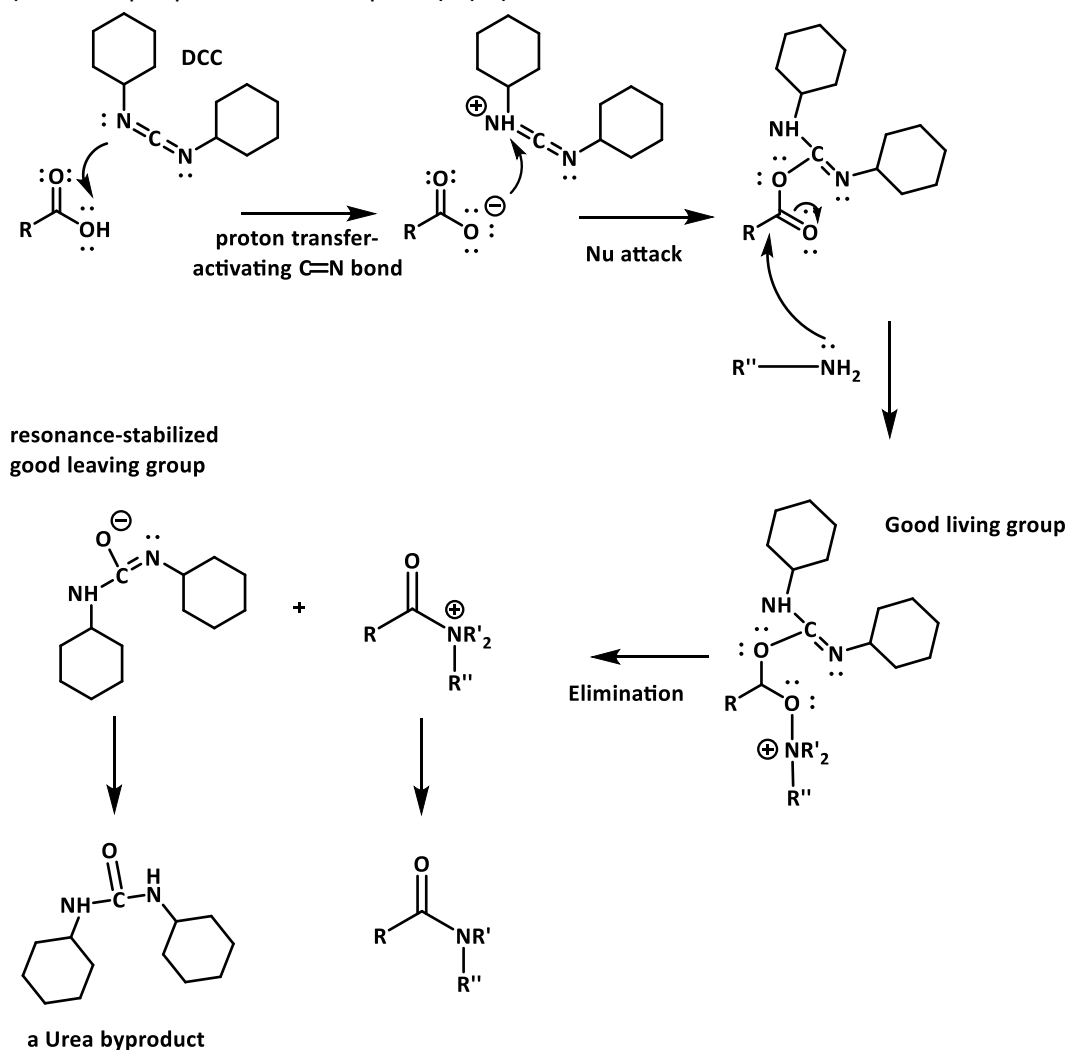
Σύνθεση της ένωσης 12



Εικόνα 48: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 12.

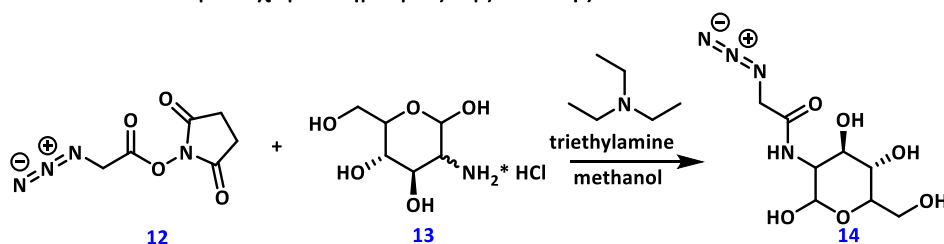
Σε ένα διάλυμα της ένωσης **11** (50 mg, 0.49 mmol) σε άνυδρο DMF (3 mL), προστέθηκε το N,N'-δικυκλοεξυλκαρβοδιιμίδιο (DCC, 101 mg, 0.49 mmol) και αργότερα ακολούθησε η προσθήκη του N-υδρόξυ σουκινιμίδιου (NHS, 56,3 mg, 0,49 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό υψηλό κενό ώστε να λάβουμε το ακατέργαστο προϊόν σαν κίτρινο λάδι. Το ακατέργαστο προϊόν ανακρυσταλλώθηκε με DMF / Hex για να δώσει έναν λευκό υγρό. (85 mg, 88%).

Ακολουθεί ο προτεινόμενος μηχανισμός εστεροποίησης με NHS. Το DCC αποτελεί ένα από τα πιο κοινά αντιδραστήρια σύζευξης προς την παρασκευή ενεργών εστέρων από ενώσεις που περιέχουν καρβοξυλικά οξέα και από NHS. Η αντίδραση αυτή οδηγεί σε ένα αδιάλυτο παραπροϊόν ουρίας που απομακρύνεται εύκολα με διήθηση.



Εικόνα 49: Προτεινόμενος μηχανισμός ενεργοποίησης οξέος με DCC.

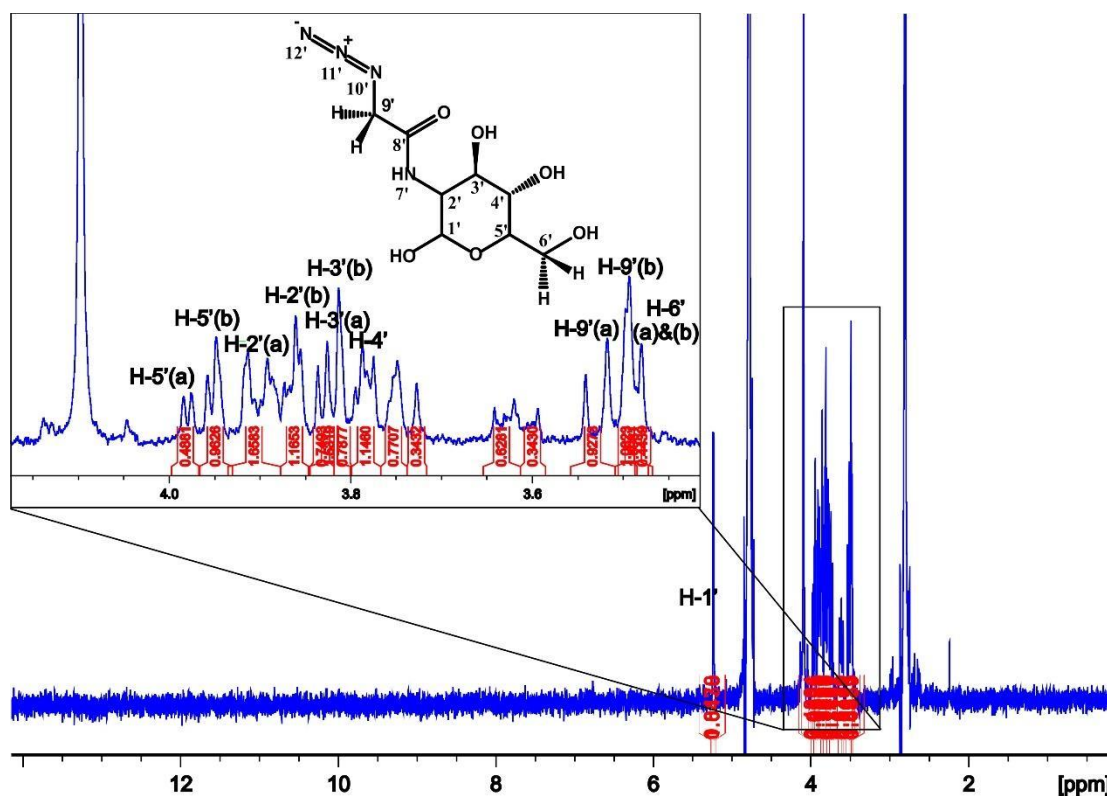
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 13



Εικόνα 50: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 14.

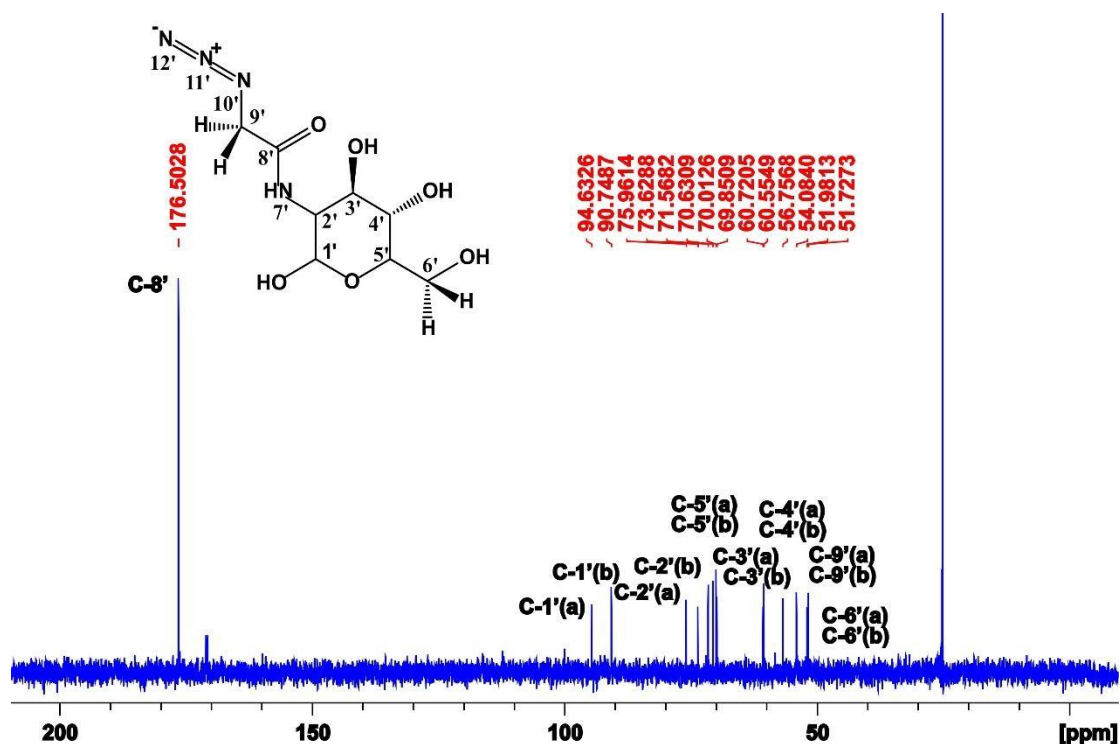
Σε ένα διάλυμα της υδροχλωρικής D-γλυκοζαμίνης (43,6 mg, 0.2 mmol) σε MeOH (2 mL), προστέθηκε τριαιθυλαμίνη (25 μ L, 0.2 mmol) και αργότερα ακολούθησε η προσθήκη της ένωσης **12** (40 mg, 0,22 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό υψηλό κενό. Το ακατέργαστο προϊόν καθαρίστηκε με υγρή χρωματογραφία HPLC (από 98:2 H₂O: ACN έως 60:40 H₂O: ACN, με απεικόνιση στα 214 nm) για να δώσει έναν υποκίτρινο λάδι (38 mg, 74%). Η αντίδραση αυτή περιγράφει μια υποκατάσταση.

Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **10** μέσω φασματοσκοπίας NMR.



Εικόνα 51: Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης 14 σε D₂O (400 MHz, 25 °C).

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ : 5.26-5.22 (d, $J=3.81$ Hz, 1H, H-1'), 3.99-3.97 (d, $J=3.81$ Hz, 1H, H-5'(a)), 3.97-3.93 (d, $J=3.81$ Hz, 1H, H-5'(b)), 3.93-3.90 (d, $J=3.81$ Hz, 1H, H-2'(a)), 3.90-3.87 (d, $J=3.81$ Hz, 1H, H-2'(b)), 3.87-3.84 (d, $J=3.81$ Hz, 1H, H-3'(a)), 3.84-3.81 (d, $J=3.81$ Hz, 1H, H-3'(b)), 3.82-3.76 (m, 1H, H-4'), 3.76-3.71 (m, 1H, H-9'(a)), 3.55-3.51 (s, 1H, H-9'(b)), 3.50-3.47 (d, $J=3.81$ Hz, 2H, H-6'(a & b)).



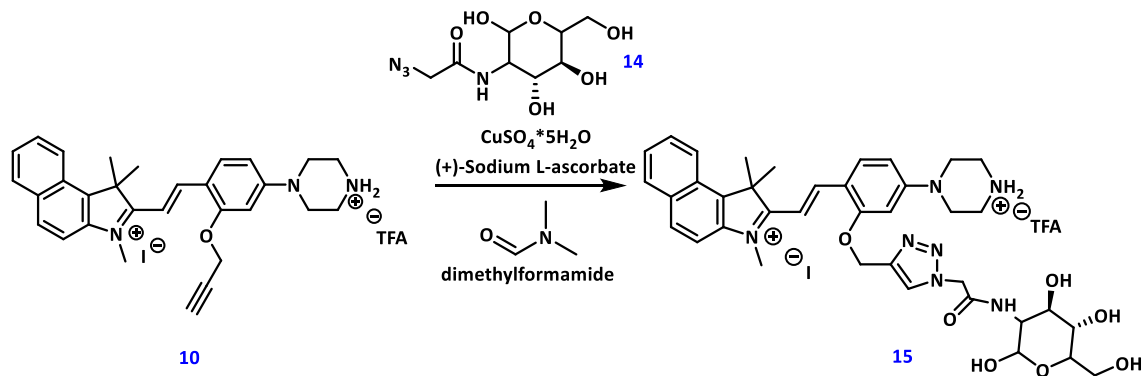
Εικόνα 52: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 14 σε D_2O (100 MHz, 25 °C).

^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ : 176.5 (C-8'), 94.63 (C-1' (a)), 90.75 (C-1' (b)), 75.96 (C-2' (a)), 73.62 (C-2' (b)), 71.57 (C-5' (a)), 70.63 (C-5' (b)), 70.01 (C-3' (a)), 69.85 (C-3' (b)), 60.72 (C-4' (a)), 60.55 (C-4' (b)), 56.76 (C-9' (a)), 54.08 (C-9' (b)), 51.98 (C-6' (a)), 51.72 (C-6' (b)).

Παρατηρήσεις:

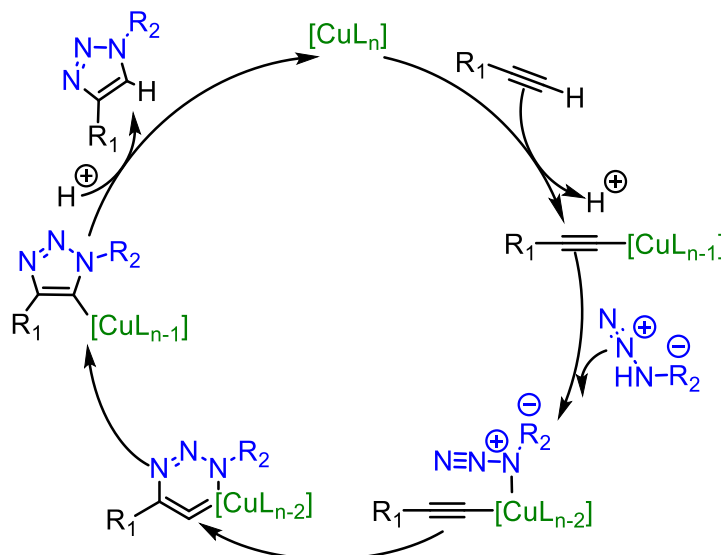
1. Το πρωτόνιο 7' είναι ευκίνητο. Ανταλλάσσεται με ευκολία με τα μόρια του διαλύτη (D_2O), με συνέπεια να μειώνεται η ένταση του και να μην είναι ορατό.
2. Χαρακτηριστικά είναι τα ανωμερικά πρωτόνια που εμφανίζονται στο εύρος των 4-5 ppm (βλ. $\text{H1}' \rightarrow \beta$ ανωμερικό $\rightarrow$ φαίνεται από το j-coupling)
3. Εμφανίζονται και οι δύο ανωμερικές μορφές (α & β), ανταλλαγή που διευκολύνεται από το γεγονός ότι το μόριο καθαρίστηκε με χρωματογραφία HPLC, δηλαδή υπό ελαφρώς όξινες συνθήκες (0.1% Τριφθοροξικό οξύ (Trifluoroacetic Acid, TFA))
4. Πιο απεντοπισμένα είναι τα ανωμερικά πρωτόνια και ακολουθεί το πρωτόνιο H-2' που βρίσκεται σε άνθρακα που διαθέτει υδροξυλομάδα αλλά και κοντά σε NH-ομάδα [105].

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 15



Εικόνα 53: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 15.

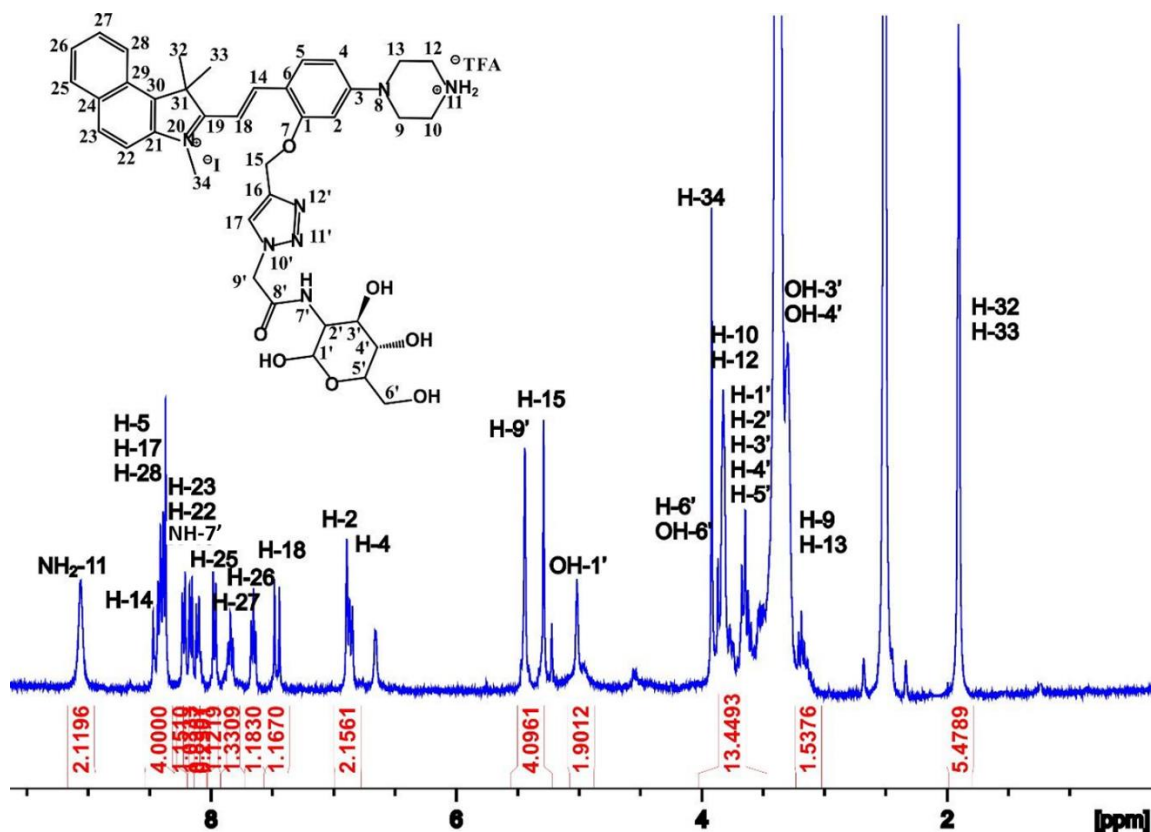
Προκειμένου να διασφαλίσουμε ότι η διαγνωστική ένωση θα συσσωρεύεται εκλεκτικά στα καρκινικά κύτταρα, πραγματοποιήθηκε αντίδραση 1,3 κυκλοπροσθήκης μεταξύ του αναλόγου που φέρει τελικό αλκίνιο και του αναλόγου που φέρει τελικό αζίδιο. Η αντίδραση αυτή καταλύεται με την παρουσία χαλκού ώστε να επιτύχουμε τοποειδικό σχηματισμό του ετεροκυκλικού 1,4-διυποκατεστημένου 1,2,3-τριαζολίου σύμφωνα με τον μηχανισμό, όπως περιγράφεται παρακάτω.



Εικόνα 54: Μηχανισμός αντίδρασης κυκλοπροσθήκης μεταξύ τελικού αλκινίου και αζιδίου που καταλύεται από χαλκό (Huisgen Cycloaddition).

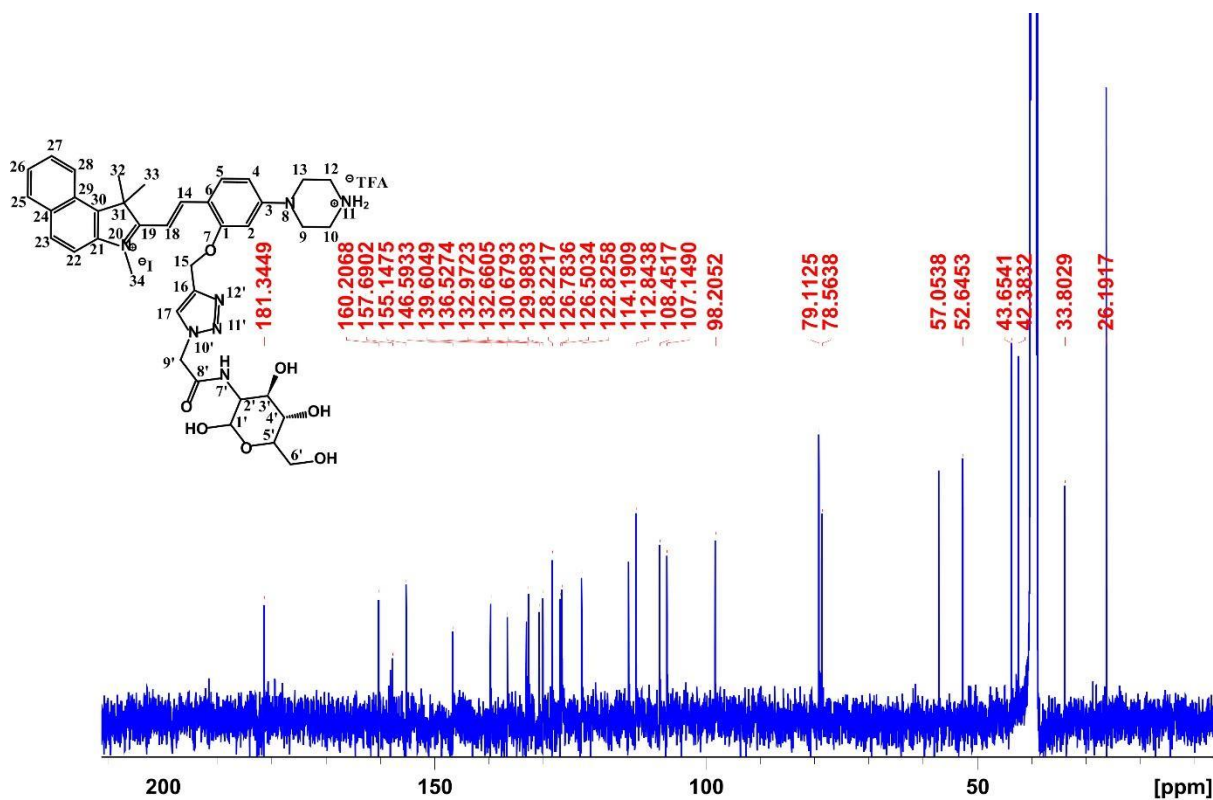
Σε ένα διάλυμα της ένωσης **10** (13.44 mg, 0.02 mmol) σε DMF/H₂O (1 mL DMF/1 mL H₂O), προστέθηκε καταλυτική ποσότητα δισθενούς χαλκού (CuSO₄·5H₂O, 0.35 mg, 0.0014 mmol) και καταλυτική ποσότητα ασκορβικού νατρίου (AsCONa, 0.76 mg, 0.0038 mmol) αργότερα ακολούθησε η προσθήκη της ένωσης **14** (10 mg, 0.038 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με TLC χρωματογραφία με σύστημα διαλυτών 3*5% MeOH/ CH₂Cl₂, v/v. Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό υψηλό κενό. Το ακατέργαστο προϊόν καθαρίστηκε με υγρή χρωματογραφία HPLC (από 90:10 H₂O: ACN έως 20:80 H₂O: ACN, με απεικόνιση στα 254 nm) για να δώσει ένα κόκκινο στερεό (6 mg, 44%).

Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **15** μέσω φασματοσκοπίας NMR.



Εικόνα 55: Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης 15 σε DMSO-d₆ (400 MHz, 25 °C).

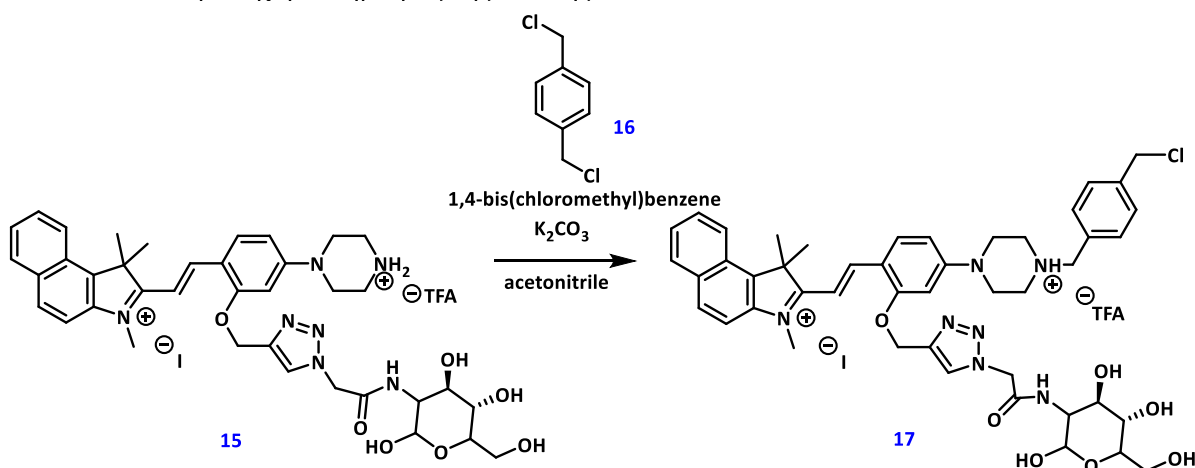
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 9.11-9.0 (s, 2H, NH₂-11), 8.48-8.42 (d, J= 16 Hz, 1H, H-14), 8.42-8.34 (m, 3H, H-5, H-17 & H-28), 8.24-8.19 (d, J=9.0 Hz, 1H, H-23), 8.18-8.14 (d, J=8.56 Hz, 1H, H-22), 8.12-8.08 (d, J= 9.0 Hz, 1H, NH-7'), 7.99-7.95 (d, J=8.56 Hz, 1H, H-25), 7.86-7.81 (t, J=7.7 Hz, 1H, H-27) 7.68-7.63 (t, J=7.7 Hz, 1H, H-26), 7.48-7.43 (d, J=16 Hz, 1H, H-18), 6.90-6.88 (s, 1H, H-2), 6.88-6.83 (d, J=8 Hz, 1H, H-4), 5.46-5.41 (s, 2H, H-9'), 5.30-5.26 (s, 2H, H-15), 5.03-4.99 (s, 1H, OH-1'), 3.95-3.90 (s, 3H, H-34), 3.90-3.89 (s, 2H, H-6'), 3.87-3.85 (s, 1H, OH-6'), 3.85-3.79 (m, 4H, H-10 & H-12), 3.79-3.50 (m, 5H, H-1', H-2', H-3', H-4', H-5'), 3.22-3.07 (m, 2H, OH-3' & OH-4'), 3.30-3.26 (s, 4H, H-9 & H-13), 2.09-2.07 (ACN), 1.92-1.88 (dd, 6H, H-32 & H-33).



Εικόνα 56: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 15 σε DMSO-d_6 (100 MHz, 25 °C).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 181.6 (C-19), 165.4 (C-8'), 161.4 (C-1), 158.1 (C-3), 157.8 (C-14), 155.4 (C-29), 147.5 (C-30), 141.8 (C-16), 139.5 (C-28), 136.7 (C-24), 133.7 (C-23), 132.6 (C-22), 130.7 (C-27), 130.0 (C-21), 128.4 (C-26), 126.9 (C-17), 126.4 (C-5), 122.7 (C-6), 114.0 (C-25), 112.8 (C-4), 108.1 (C-18), 106.9 (C-2), 97.9 (C-1'), 90.6 (C-3'), 72.2 (C-4'), 71.1 (C-5'), 70.6 (C-10 & C-12), 62.5 (C-15), 61.1 (C-6'), 52.6 (C-2'), 51.7 (C-9'), 43.7 (C-9 & C-13), 42.5 (C-34), 26.3 (C-32 & C-33).

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 17



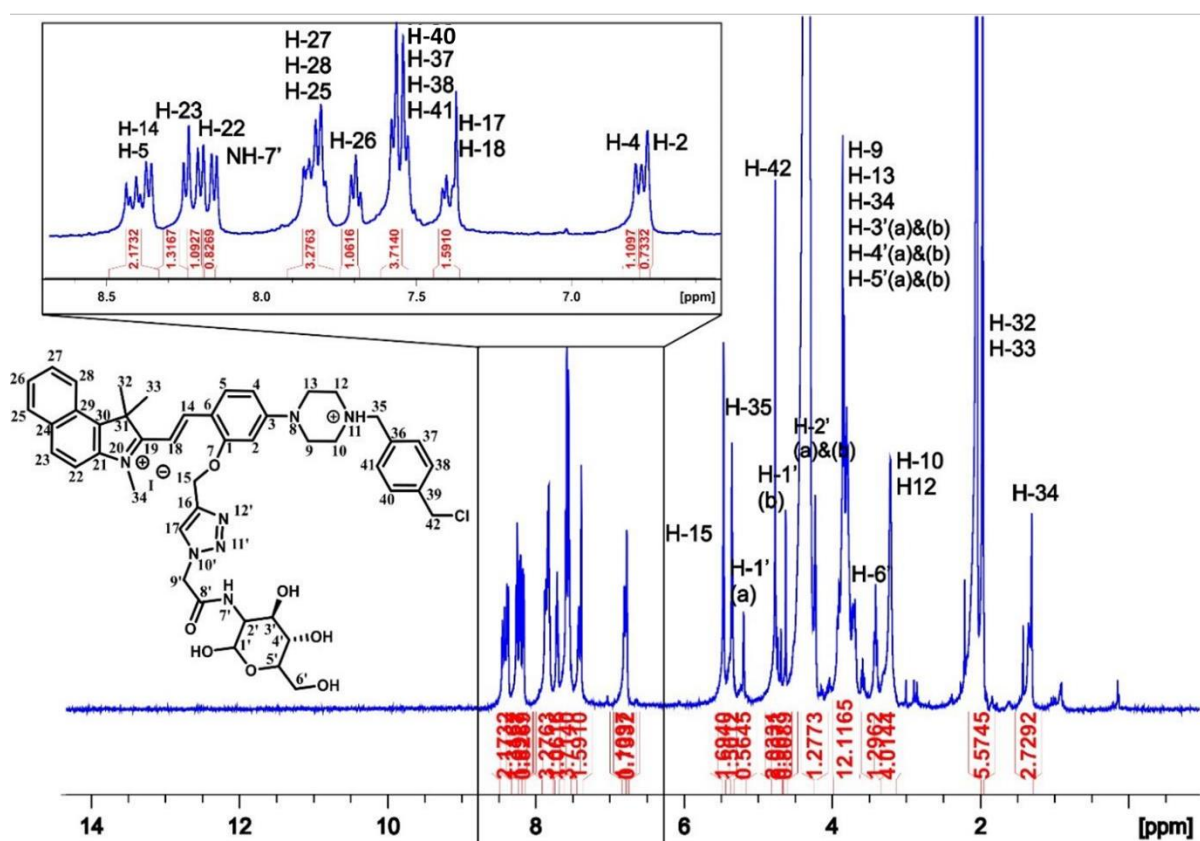
Εικόνα 57: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 17.

Για την ολοκλήρωση της σύνθεσης της διαγνωστικής ένωσης **17**, απαιτείται μια αντίδραση $\text{S}_{\text{N}}2$ υποκατάστασης μεταξύ της δευτεροταγούς αμινομάδας του πιπεραζινικού δακτυλίου της ένωσης **15**, και του ενός χλωρίου του δίχλωρο *p*-ξυλυλενίου. Η εισαγωγή της συγκεκριμένης λειτουργικής ομάδας πραγματοποιείται αφενός για να περιοριστεί η περιστροφή του πιπεραζινικού

δακτυλίου και αφετέρου λόγω της παρουσίας του χλωρίου να επιτραπεί η ομοιοπολική σύνδεση της ένωσης **17** σε κάποιον φορέα μέσω ομοιοπολικού δεσμού. Ο φορέας αυτός θα μπορούσε να αποτελεί κάποιο πεπτίδιο, ένζυμο ή πρωτεΐνη και θα πρέπει να φέρει ελεύθερη είτε υδροξυλομάδα είτε σουλφυδρυλομάδα προκειμένου να πραγματοποιηθεί βιοσύζευξη.

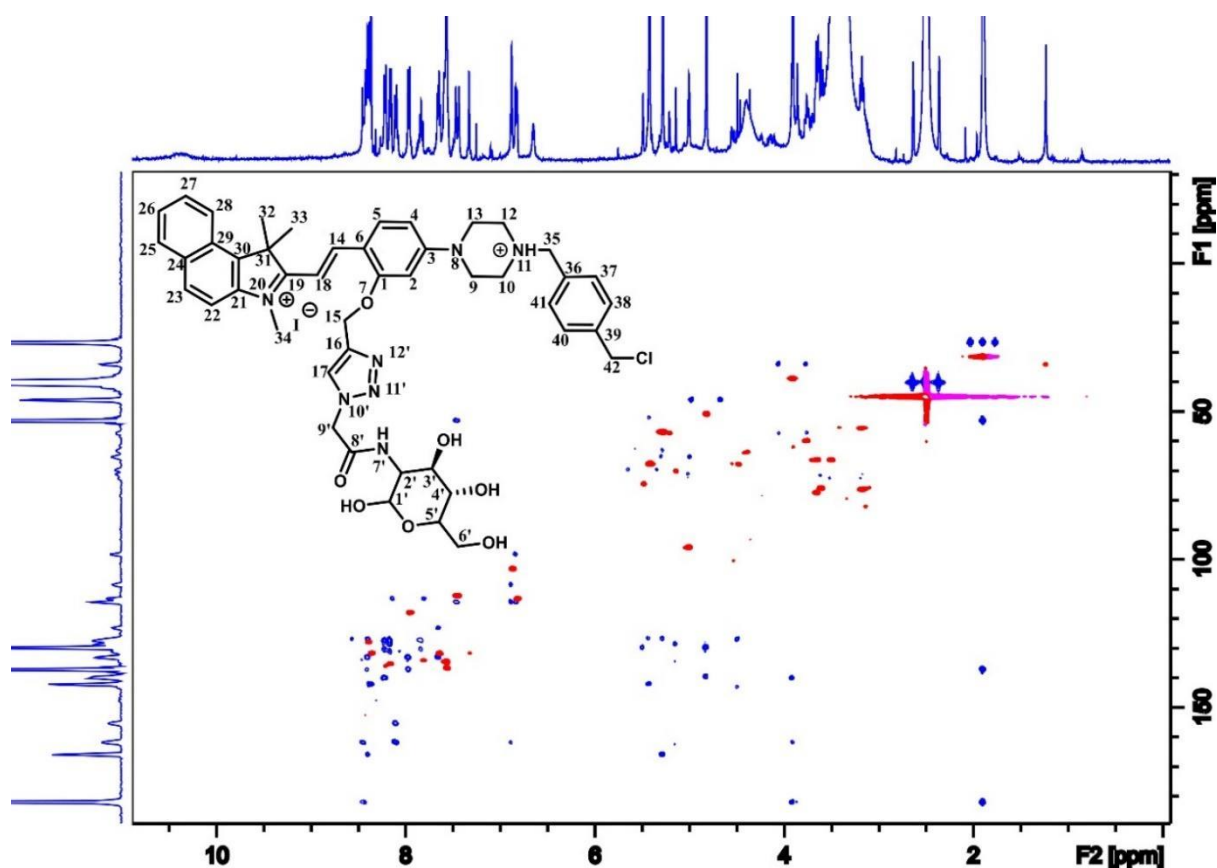
Σε ένα διάλυμα της ένωσης **15** (6 mg, 0.006 mmol) σε άνυδρο MeCN (2 mL), προστέθηκε ποσότητα άλατος καλίου και ανθρακικών ιόντων K_2CO_3 (1.8 mg, 0.012 mmol) και αργότερα ακολούθησε η προσθήκη του δίχλωρο *p*-ξυλυλενίου (10.5 mg, 0.06 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε και θερμάνθηκε με αναρροή για 15 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με TLC χρωματογραφία με σύστημα διαλυτών 3*5% MeOH/ CH_2Cl_2 , v/v. Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό υψηλό κενό. Το ακατέργαστο προϊόν καθαρίστηκε με υγρή χρωματογραφία HPLC (από 75:25 H_2O : ACN έως 0:100 H_2O : ACN, με απεικόνιση στα 254 nm) για να δώσει ένα κόκκινο στερεό (5 mg, 81%).

Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **17** μέσω φασματοσκοπίας NMR και φασματομετρίας μάζας.



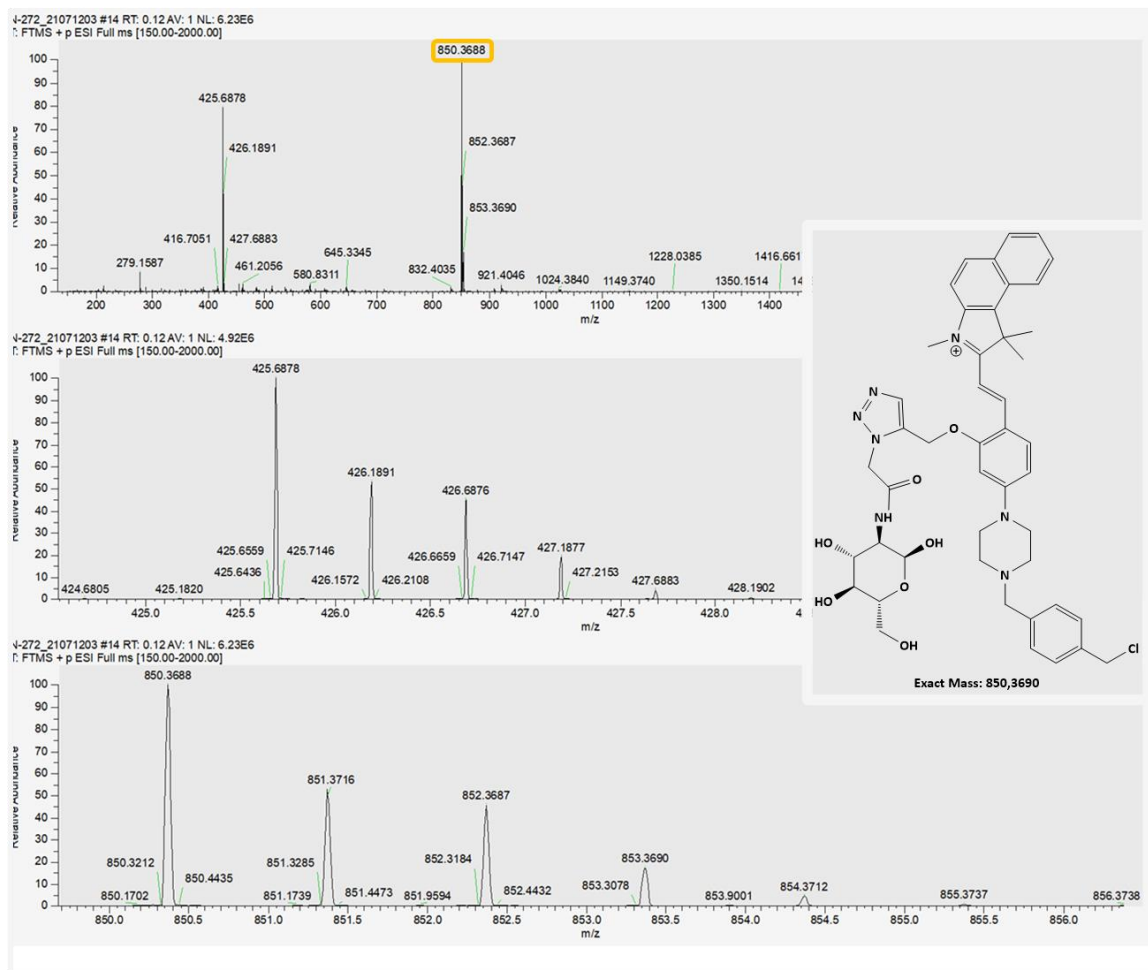
Εικόνα 58: Φάσμα 1H -NMR της ένωσης **17** σε CD_3CN (50%)-PBS BUFFER (50% D_2O) (500 MHz, 25 °C).

1H NMR (500 MHz, CD_3CN (50%)-PBS BUFFER (50% D_2O)) δ : 8.49-8.35 (m, 2H, H-14, H-5), 8.3-8.23 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, H-23), 8.23-8.19 (d, $J=9$ Hz, 1H, H-22), 8.18-8.14 (d, $J=8.2$ Hz, 1H, NH-7'), 7.9-7.79 (m, 3H, H-27, H-28, H-25), 7.74-7.68 (t, $J=7.56$ Hz, 1H, H-26), 7.61-7.53 (m, 4H, H-40, H-41, H-37, H-38), 7.46-7.38 (m, 2H, H-17, H-18), 6.83-6.78 (d, $J=9.3$ Hz, 1H, H-4), 6.78-6.75 (s, 1H, H-2), 5.49-5.45 (s, 2H, H-15), 5.37-5.33 (m, 2H, H-35), 5.21-5.17 (d, $J=2.8$ Hz, 1H, H-1'(a)), 4.79-4.76 (s, 2H, H-42), 4.75-4.67 (m, 1H, H-1'(b)), 4.63-4.61 (s, 1H, H-2'(a)), 4.24-4.20 (s, 1H, H-2'(b)), 3.95-3.66 (m, 12H, H-9, H-13, H-34, H-3'(a), H-3'(b), H-4'(a), H-4'(b), H-5'(a), H-5'(b)), 3.48-3.38 (t, $J=9.53$ Hz, 1H, H-6'), 3.27-3.14 (br, 4H, H-10, H-12), 1.99-1.93 (br, 6H, H-32, H-33), 1.38-1.28 (m, 3H, H-34).



Εικόνα 59: Υπέρθεση φασμάτων 2D ^1H - ^{13}C HSQC (κόκκινο)-HMQC (μπλε) της ένωσης 17 σε CD_3CN (50%)-PBS BUFFER (50% D_2O) (500 MHz, 25 °C).

^{13}C NMR (500 MHz, CD_3CN (50%)-PBS BUFFER (50% D_2O)) δ : 182.2 (C-19), 165.8 (C-8'), 161.6 (C-1), 155.1 (C-3), 147.9 (C-14), 142.3 (C-16), 140.0 (C-29), 138.6 (C-39), 137.2 (C-30), 134.4 (C-28), 133.2 (C-24), 131.17 (C-23, 41, 37), 130.8 (C-36), 130.4 (C-22), 129.7 (C-40, 38), 128.7 (C-21, C-27), 127.4 (C-26), 126.9 (C-17), 123.3 (C-5 & C-7'), 114.4 (C-6), 113.1 (C-25), 108.8 (C-4), 107.3 (C-18), 98.4 (C-2), 91.0 (C-1'), 72.6 (C-3'), 71.1 (C-4'), 71.0 (C-9 & C-10), 64.8 (C-5'), 62.9 (C-35), 61.6 (C-15), 61.4 (C-6'), 54.9 (C-2'), 53.0 (C-31), 52.0 (C-9'), 50.7 (C-9 & C-13), 45.8 (C-42), 34.0 (C-34), 26.7 (C-32 & C-33).

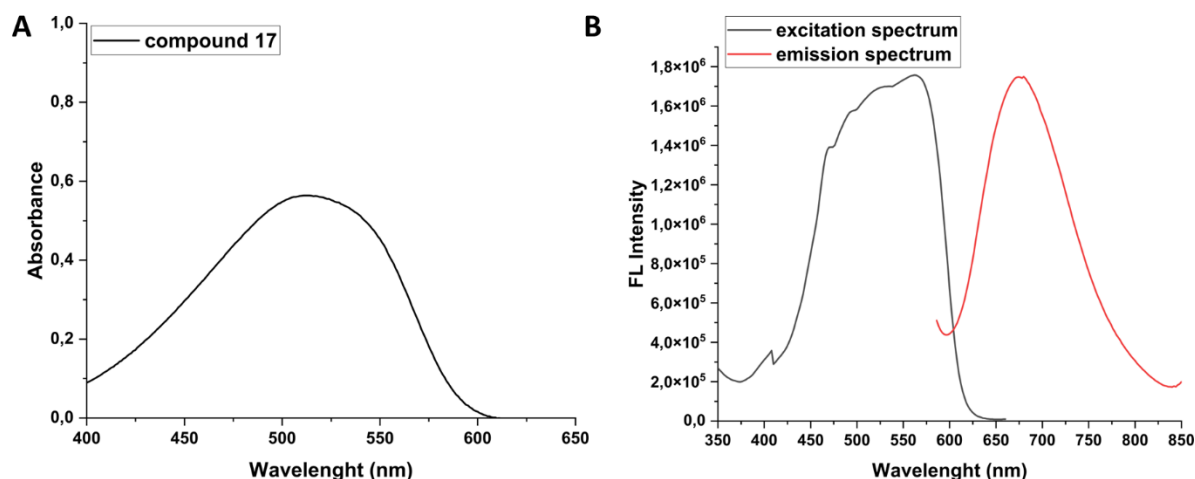


Εικόνα 60: Φάσμα μάζης υψηλής ανάλυσης της ένωσης 17. Το m/z 850.37 αντιστοιχεί στο $[M^+]$.

Από το φάσμα μάζης αναμέναμε ένα θραύσμα σε m/z 850,3690. Λάβαμε ένα θραύσμα σε m/z 850,3688 που αφορά το $[M^+]$. Επίσης λάβαμε ένα θραύσμα σε m/z 425,6878 που πιθανά αφορά το $[M^+ + H^+]$. Τέλος από τις επιπλέον εικόνες μπορούμε να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη του αλογόνου.

2.2.2 Φασματοσκοπικές ιδιότητες και εκλεκτικότητα της ένωσης 17

Προκειμένου να αξιολογήσουμε τις φασματοσκοπικές ιδιότητες της ένωσης 17, πραγματοποιήθηκαν πειράματα τόσο με φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους όσο και φασματοσκοπία φθορισμού. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα της ένωσης (10 μ M σε DMSO: PBS, pH 7.40, 1:1 v/v), σε pH 7.4, για να μελετήσουμε τις φασματοσκοπικές της ιδιότητες σε περιβάλλον που να προσομοιάζει εκείνο του πλάσματος του αίματος. Παρατηρούμε ότι εμφανίζει ένα διακριτό φάσμα απορρόφησης με το $\lambda_{\max}$ να εστιάζεται στα 516 nm. Επίσης μελετήθηκαν τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής με λ_{exc} 564 nm και λ_{em} 678 nm. Τέλος υπολογίστηκε η μετατόπιση Stokes ίση με 114 nm.



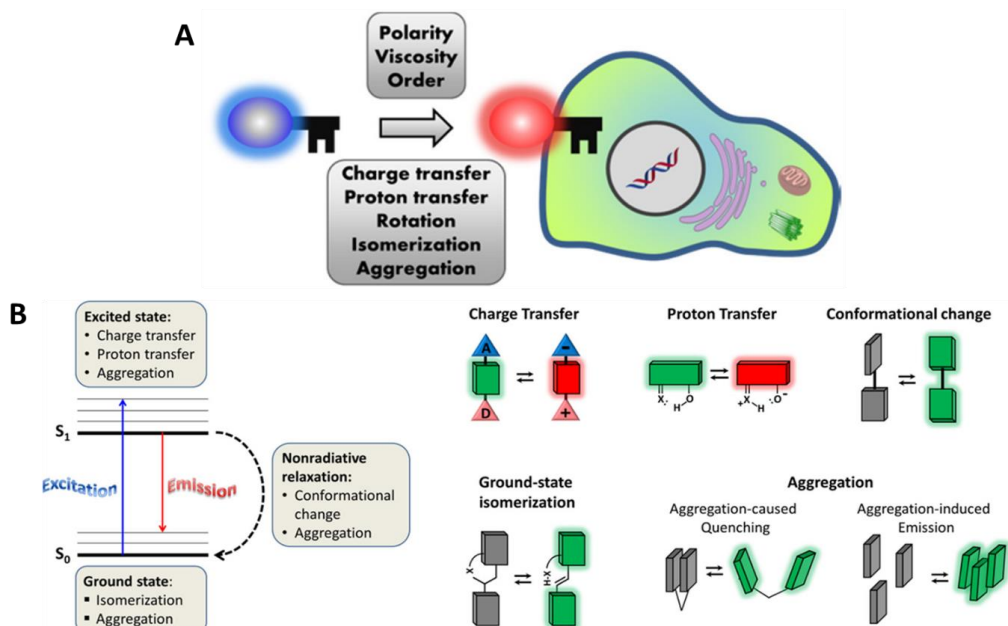
Εικόνα 61: Φάσματα Α) Απορρόφησης και Β) Φθορισμού της ένωσης της ένωσης 17 (10 μ M) του δείγματος σε 50% DMSO, 50% PBS buffer (Phosphate-Buffered Saline, 10 mM, pH 7.4) σε θερμοκρασία 25 $^{\circ}$ C και step 2, ExBw: 10,EmBw: 10.

Πίνακας 3: Μήκη κύματος απορρόφησης, διέγερσης, εκπομπής και μετατόπιση Stokes της ένωσης 17.

λ_{abs} (nm)	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emission}}$ (nm)	Stokes shift (nm)
516	564	678	114

Λαμβάνοντας υπόψιν τη δομή της ένωσης, δηλαδή την ύπαρξη ενός δότη και ενός δέκτη που συνδέονται μέσω μιας π-γέφυρας ηλεκτρονίων, καθώς και την μετατόπιση Stokes που υπερβαίνει τα 100 nm, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι η ένωση φθορίζει μέσω ICT φαινομένου. Επίσης η εκπομπή της ένωσης σε pH 7.4 ξεπερνά τα 600 nm, επομένως αποτελεί μια NIR χρωστική. Συμπερασματικά φαίνεται να αποτελεί μια καλή χρωστική που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν διαγνωστικό με καλή ιστική διείσδυση.

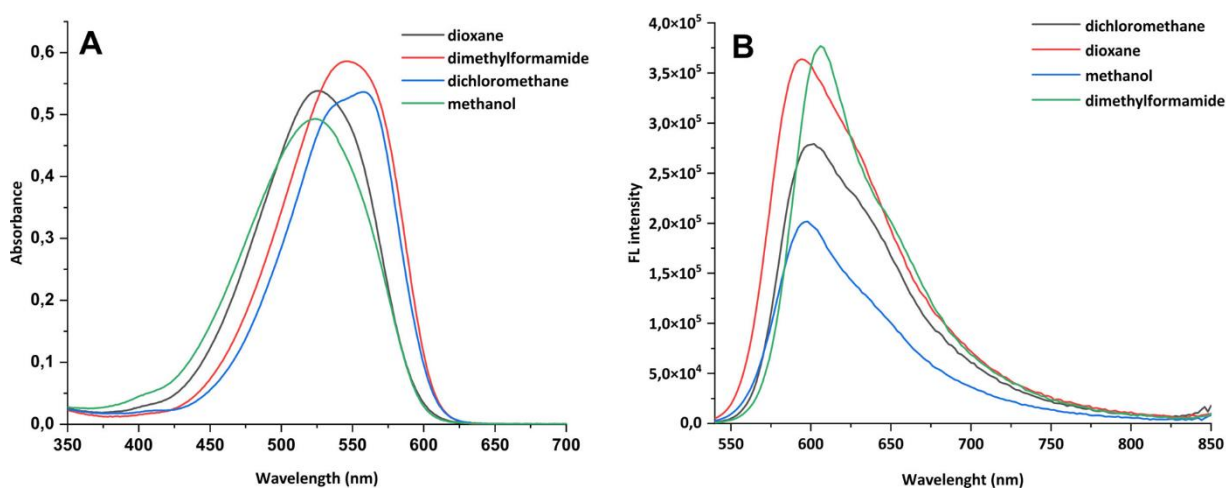
Με βάση τον τύπο απόκρισης, υπάρχουν χρωμοφόροι ανιχνευτές (π.χ. σολβατοχρωματικοί) ανιχνευτές, οι οποίοι αλλάζουν την ένταση και το χρώμα του φθορισμού τους, με αλλαγές στο χημικό περιβάλλον τους.



Εικόνα 62: Α) Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου ανίχνευσης της μεταβολής του τοπικού μικροπεριβάλλοντος από σολβατοχρωμικούς ανιχνευτές. Β) Απλοποιημένο διάγραμμα Jablonski και οι βασικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στους σολβατοχρωμικούς ανιχνευτές [106].

Οι ανιχνευτές που μελετώνται σε αυτήν την εργασία φέρουν ομάδες δότη και δέκτη, τα λεγόμενα φθοροφόρα push-pull. Η δομή ώθησης-έλξης διασφαλίζει ότι μετά την απορρόφηση φωτός το φορτίο μεταφέρεται από την ομάδα δότη στον δέκτη, γεγονός που δημιουργεί μια εξαιρετικά διπολική κατάσταση διεγέρσεως (**Εικόνα 62B**). Η διπολική ροπή της διεγερμένης κατάστασης σταθεροποιείται μέσω της αλληλεπίδρασης με τα δίπολα του διαλύτη και έτσι η εκπομπή του μετατοπίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος σε πιο πολικούς διαλύτες **Εικόνα 23B**. Επίσης, οι περισσότερες από τις χρωστικές push-pull αποσβαίνουν σε πολικούς πρωτικούς διαλύτες, γενικά λόγω της μεταφοράς ηλεκτρονίων και της συστραμμένης ενδομοριακής μεταφοράς φορτίου (TICT). Στην πραγματικότητα, οποιαδήποτε βιομοριακή αλληλεπίδραση ή αλλαγή στη βιομοριακή οργάνωση έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή του τοπικού μικροπεριβάλλοντος, και μπορεί να παρακολουθείται άμεσα από αυτούς τους τύπους ανιχνευτών [106]. Η αλληλεπίδραση με βιομόρια θα πρέπει βασικά να έχει ως αποτέλεσμα τον αποκλεισμό των τοπικών μορίων του νερού, μειώνοντας έτσι την πολικότητα του περιβάλλοντος. Επομένως, μπορεί έτσι να γίνει ανίχνευση βιομοριακών αλληλεπιδράσεων.

Επομένως πραγματοποιήθηκαν πειράματα της ένωσης **17** (10 μM) σε διαλύτες με διαφορά στην πολικότητα και την ικανότητα τους να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου (σε μη πολικό διαλύτη, σε πολικό απρωτικό διαλύτη και σε πολικό πρωτικό διαλύτη). Παρατηρούμε ότι τόσο το φάσμα ορατού υπεριώδους όσο και το φάσμα φθορισμού στην MeOH συγκριτικά με τους μη πολικούς διαλύτες παρουσιάζει χαμηλότερη ένταση. Μπορούμε δηλαδή να υποθέσουμε ότι η ένωση θα παρουσιάζει μεταβολή στην ένταση απορρόφησης και φθορισμού σε διαφορετικά περιβάλλοντα π.χ., σε περιβάλλοντα υψηλού ιξώδους. Πράγματι η χρωστική που συνθέσαμε χαρακτηρίζεται από έναν δότη και ένα δέκτη ηλεκτρονίων μεταξύ των οποίων ρέει το φορτίο. Επίσης, διαθέτει μια ομάδα που περιστρέφεται και σε περιβάλλοντα με υψηλό ιξώδες η περιστροφή μπορεί να περιοριστεί και να έχουμε μεταφορά φορτίου μέσω δεσμών.



Εικόνα 63: Φάσματα: Α) Απορρόφησης και Β) Φθορισμού της ένωσης της ένωσης **17** (10 μM) του δείγματος σε μη πολικό διαλύτη, σε πολικό απρωτικό διαλύτη και σε πολικό πρωτικό διαλύτη. Το σχήμα περιγράφει τα φάσματα του ανιχνευτή παρουσία φαινομένων διαλυτοποίησης, κατόπιν διέγερσης στα 525 nm σε θερμοκρασία 25°C, με step 2, ΕκΒw: 2, EmΒw: 2.

Πίνακας 4: Μήκη κύματος απορρόφησης και εκπομπής της ένωσης **17** συναρτήσει του διαλύτη.

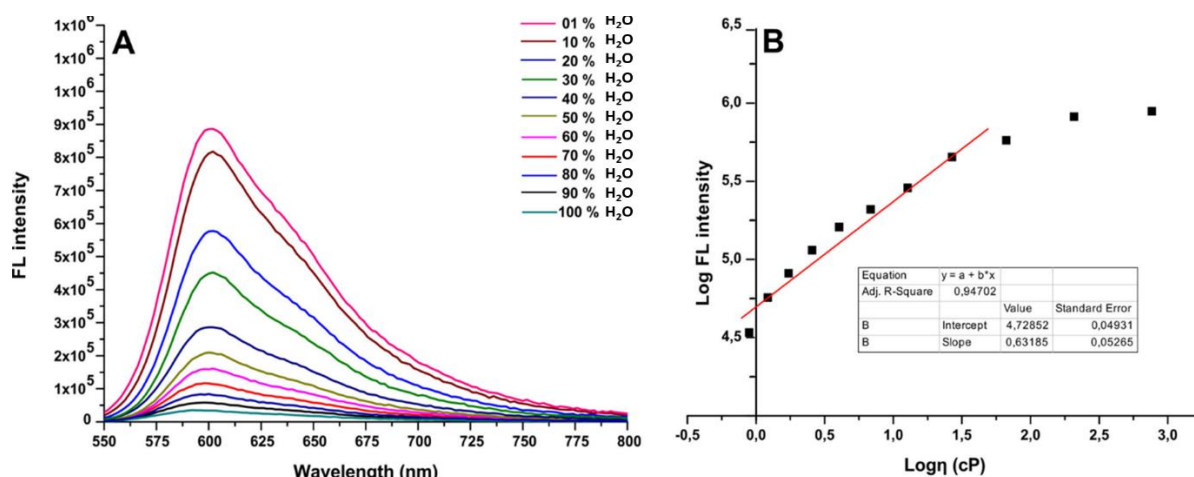
Διαλύτης	λ abs (nm)	λ em (nm)
Διοξάνιο (dioxane)	528	594
Μη πολικός διαλύτης		

Διμεθυλφορμαμίδιο (dimethylformamide) Πολικός απρωτικός διαλύτης	547	606
Διχλωρομεθάνιο (dichloromethane) Πολικός απρωτικός διαλύτης	560	602
Μεθανόλη (methanol) Πολικός πρωτικός διαλύτης	524	598

Δεν παρατηρούμε κάποια χαρακτηριστική μετατόπιση στο ερυθρό όσο αυξάνεται η πολικότητα του διαλύτη. Επομένως συμπεραίνουμε ότι η ένωση δεν λειτουργεί μέσω του φαινομένου TICT μιας και το φαινόμενο αυτό περιγράφει μια διπλή διεγερμένη κατάσταση- μία που να αντιπροσωπεύει την υγρή της φάση και μια που να αντιπροσωπεύει την στερεή της φάση, εκείνη δηλαδή που περιορίζει την περιστροφή.

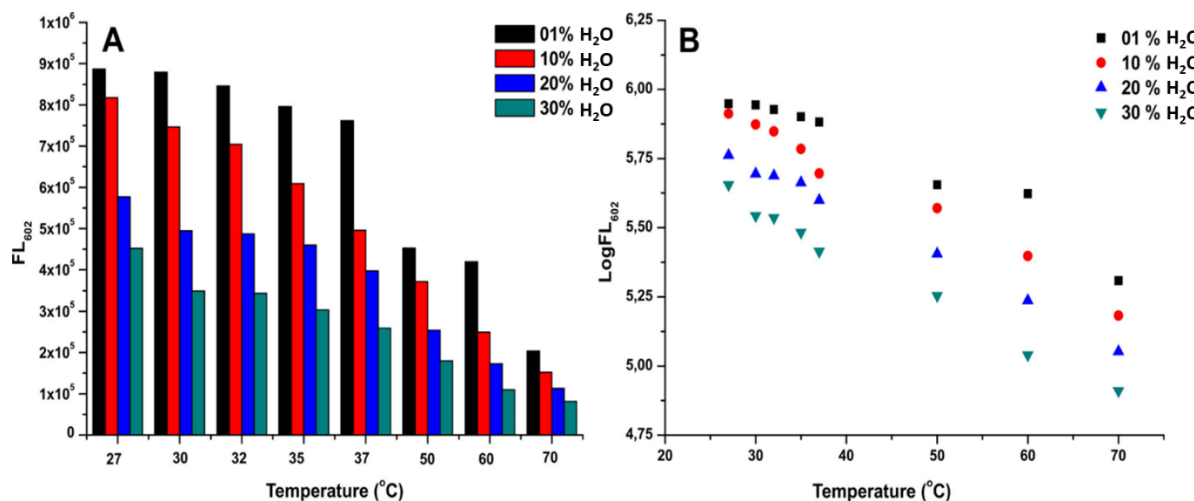
Επιπρόσθετα, για να αξιολογήσουμε την απόκριση της ένωσης **17** στη μεταβολή του ιξώδους πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού χρησιμοποιώντας διαφορετικά δυαδικά μίγματα γλυκερόλης/νερού (από 0% έως 99%) αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου (27 °C). Ο λόγος που χρησιμοποιούνται αυτά τα μίγματα είναι ο προφανής ότι η γλυκερόλη παρουσιάζει υψηλό ιξώδες, ενώ τα δυαδικά αυτά συστήματα μπορούν να δώσουν αντιπροσωπευτικές τιμές ιξώδους όπως αναφέρεται αναλυτικότερα στο παράρτημα του κειμένου. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 64**, η ένωση **17** σε αυτά τα υδατικά μέσα εμφανίζει ένα ασθενές σήμα φθορισμού. Με σταδιακή αύξηση του ποσοστού γλυκερόλης, παρατηρήθηκε ότι το σήμα φθορισμού αυξήθηκε σημαντικά (~ **26 φορές**). Αυτή η αύξηση της έντασης του σήματος φθορισμού θα μπορούσε να αποδοθεί μείωση της περιστροφής σε ιξώδη περιβάλλοντα καθώς στα παχύρευστα μέσα η ενδομοριακή περιστροφική κίνηση είναι σημαντικά περιορισμένη. Επομένως, η χρωστική αυτή αποτελεί ένα μοριακό ρότορα φθορισμού. Αυτό μπορεί να επιβεβαιωθεί αν σκεφτεί κανείς την δομή του μορίου. Πιο συγκεκριμένα υπάρχει η ομάδα πιπεραζίνης που αντιπροσωπεύει την περιστρεφόμενη ομάδα και η ομάδα στόχευσης πρωτεΐνης που αποτελεί την σταθερή ομάδα.

Επιπλέον, η ένταση του φθορισμού εμφάνισε εξαιρετική γραμμικότητα ($R^2 = 0.947$) στη μεταβολή του διαλύτη από νερό ($\log \eta$ -0.05 cP) σε γλυκερόλη (99%, $\log \eta$ 2.88 cP). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ένωση **17** είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στη μεταβολή του ιξώδους και θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί σαν ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο ώστε να προσδιορίσει τη μεταβολή του ιξώδους σε ένα κυτταρικό μικροπεριβάλλον. Μάλιστα το ιξώδες των μιτοχονδρίων υπολογίζεται ότι κυμαίνεται από περίπου $\log \eta$ 1.5 cP έως $\log \eta$ 2 cP, επομένως η προσομοίωση του ιξώδους με το δυαδικό σύστημα γλυκερόλης/νερού είναι λογική και καθιερωμένη στη διεθνή βιβλιογραφία.



Εικόνα 64: Α) Φάσματα φθορισμού της ένωσης της ένωσης 17 (10 μ M) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης-νερού (από 0% έως 99% γλυκερόλη) κατόπιν διέγερσης στα 525 nm. Β) Συσχετισμός του λογάριθμου της έντασης φθορισμού στα 660 nm με τον λογάριθμο του ιξώδους (η) στο ίδιο σύστημα γλυκερόλης-νερού. κατόπιν διέγερσης στα 525 nm σε θερμοκρασία 25°C, με step 2, ExBw: 1, EmBw: 1.

Στη συνέχεια, δεδομένου πως το ιξώδες επηρεάζεται σημαντικά από τη μεταβολή της θερμοκρασίας πραγματοποιήθηκαν συμπληρωματικές μελέτες σε διαφορετικές θερμοκρασίες [107]. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 65 Α**, η διαφορά της έντασης του σήματος φθορισμού της ένωσης 17 στα διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης νερού διατηρείται παρά το γεγονός ότι η θερμοκρασία αυξάνεται σημαντικά από 27 °C σε 70 °C. Επιπλέον, όπως απεικονίζεται και στην **Εικόνα 65 Β** η μεταβολή του λογαρίθμου της έντασης του φθορισμού μειώνεται σε υψηλές θερμοκρασίες ενώ παράλληλα εμφανίζεται μεγάλη γραμμικότητα ανεξάρτητα του δυαδικού συστήματος γλυκερόλης/νερού.

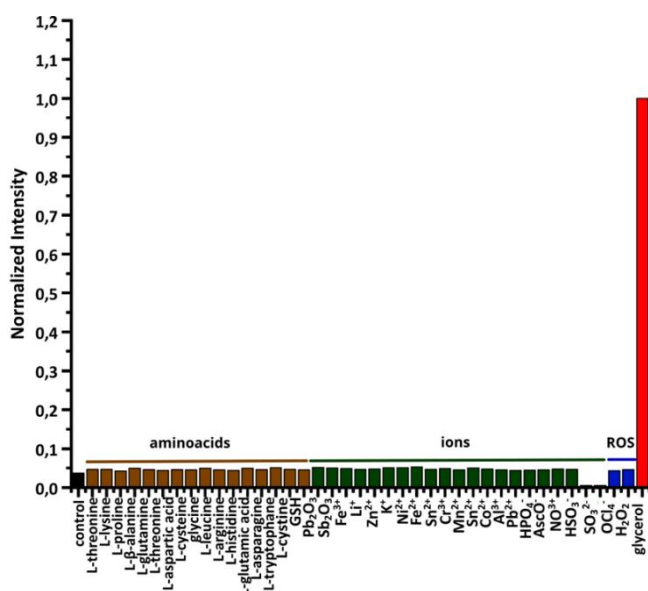


Εικόνα 65: Α) Συσχέτιση της μεταβολής της έντασης του φθορισμού FL₆₀₂ της ένωσης 17 (10 μ M) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού με τη θερμοκρασία Β) Συσχέτιση του λογαρίθμου έντασης του φθορισμού FL₆₀₂ (10 μ M) της ένωσης 17 και της θερμοκρασίας στα διαφορετικά συστήματα γλυκερόλης/νερού, με step 2, ExBw: 1, EmBw: 1.

Σε αυτό το σημείο μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η αύξηση της έντασης του φθορισμού οφείλεται πράγματι στο ιξώδες και όχι σε άλλες παραμέτρους όπως η αύξηση της διαλυτότητας της στην γλυκερόλη.

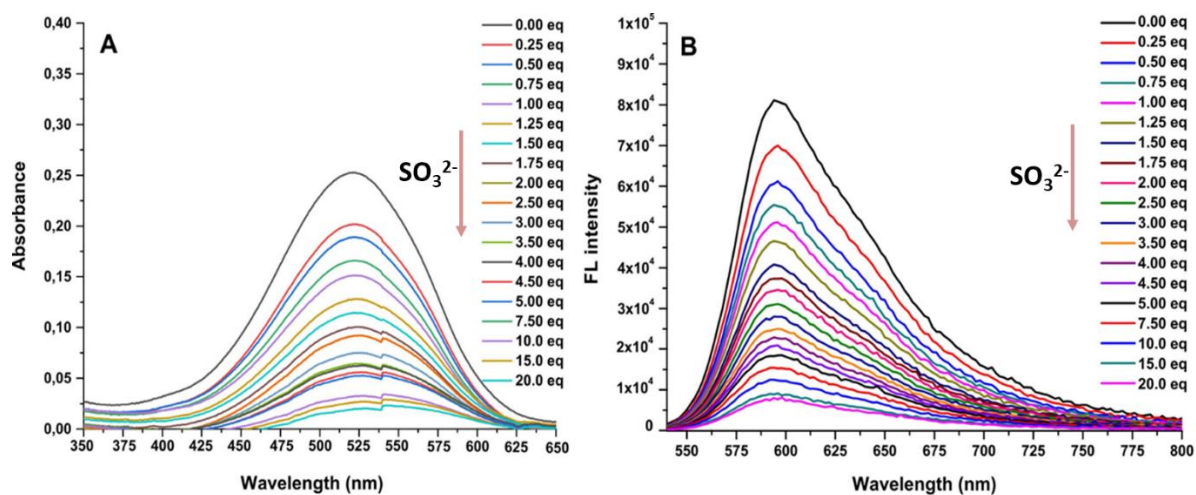
Έπειτα παρουσιάζονται τα πειράματα εκλεκτικότητας της ένωσης παρουσία διαφορετικών αναλυτών συμπεριλαμβανομένων μετάλλων (K⁺, Na⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Pb⁴⁺, Al³⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Fe³⁺, Cr³⁺, Sb³⁺, Sn⁴⁺), αμινοξέων (ιστιδίνη, λευκίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, προλίνη, θρεονίνη, τρυπτοφάνη,

κυστεΐνη, γλουταμινικό οξύ, γλουταμίνη, γλυκίνη, γλουταθειόνη, αλανίνη, αργινίνη, ασπαραγίνη, ασπαρτικό οξύ), ορισμένων υπεροξειδίων (H_2O_2 , OCl_4^- , HSO_3^- , SO_3^{2-}) και φυσικά της γλυκερόλης. Η αξιολόγηση έλαβε χώρα με φασματοσκοπία φθορισμού παρακολουθώντας την μεταβολή στα 600 nm. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 66**, ο λόγος αυτός δεν εμφάνισε ιδιαίτερη μεταβολή με την προσθήκη άλλων αναλυτών (100 μM) πέραν της γλυκερόλης (~ 26 φορές), και λιγότερο των HSO_3^- και SO_3^{2-} (~ 12 φορές), υποδεικνύοντας την υψηλή εκλεκτικότητα της ένωσης.



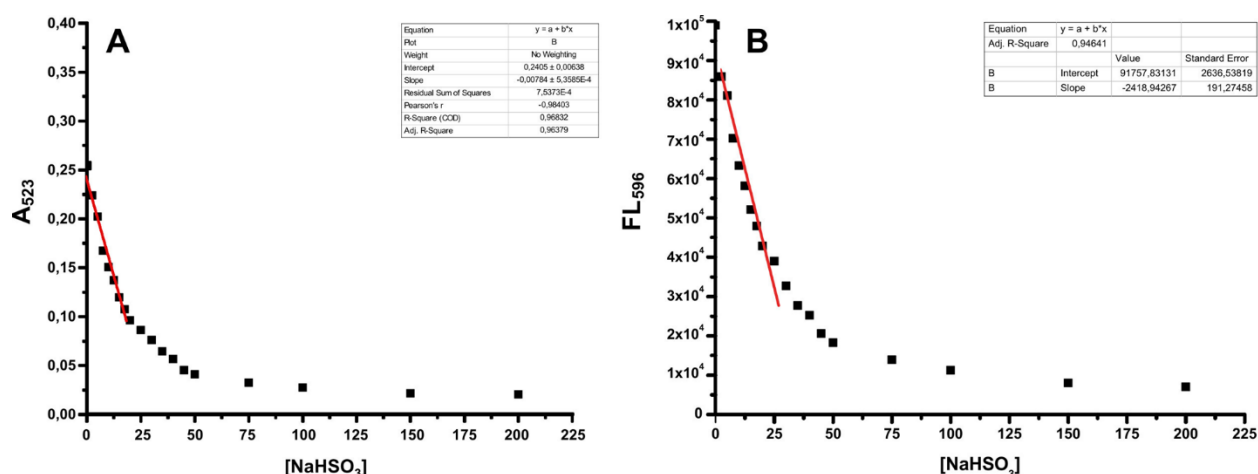
Εικόνα 66: Απόκριση του σήματος φθορισμού (I/I₀ στα 600 nm) της ένωσης **17** (10 μM) έναντι διάφορων αναλυτών (100 μM), με PBS buffer (Phosphate-buffered saline, 10 mM, pH 7.4) σε θερμοκρασία 25 °C και step 2, ExBw: 2, EmBw: 2.

Από την παραπάνω εικόνα παρατηρούμε την ανταπόκριση της ένωσης πέραν της γλυκερόλης και στα όξινα θειώδη (HSO_3^-) και τα θειώδη (SO_3^{2-}) ανιόντα. Προκειμένου λοιπόν, να παρακολουθήσουμε την απόκριση της ένωσης **17** έναντι των θειώδων (SO_3^{2-}) ανιόντων πραγματοποιήθηκαν πειράματα τιτλοδότησης μέσω φασματοσκοπίας ορατού υπεριώδους και φθορισμού. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 67 A** η ένωση **17** σε PBS (10 mM pH 7.4) κατόπιν σταδιακής προσθήκης θειώδων από διαλύματα συγκέντρωσης 100 μM (εώς 20.0 eq) παρατηρήθηκε μια διακριτή μείωση της απορρόφησης. Στη συνέχεια, αξιολογήσαμε την απόκριση της ένωσης **17** μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού κατόπιν διέγερσης στα 525 nm και με σταδιακής προσθήκη θειώδων από διαλύματα συγκέντρωσης 100 μM (εώς 20.0 eq). Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 67 B** καταγράφηκε μια αξιοσημείωτη μείωση του φάσματος φθορισμού στα 600 nm ~8 φορές.



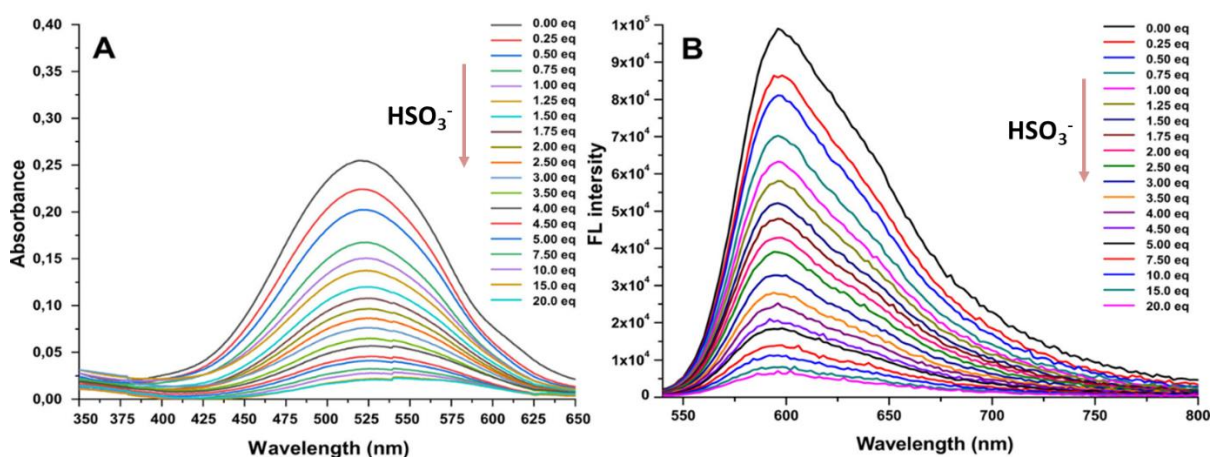
Εικόνα 67: Α) Φάσμα απορρόφησης της ένωσης **17** (10 μM) σε PBS (10 mM, pH 7.4). παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης Na_2SO_3 (Β) Φάσματα φθορισμού της ένωσης **17** (10 μM) σε PBS (10 mM, pH 7.4). παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης Na_2SO_3 κατόπιν διέγερσης στα 525 nm, σε θερμοκρασία 25 $^\circ\text{C}$ και step 2, ExBw: 2,EmBw: 2.

Επίσης παρουσιάζουν εξαιρετική γραμμικότητα (0.96 και 0.95 αντίστοιχα). Το όριο ανίχνευσης της ένωσης **17** υπολογίστηκε ίσο με 0,005818 mM με φασματοσκοπία φθορισμού υποδεικνύοντας ότι η ένωση διαθέτει υψηλή ευαισθησία στην υπερέκφραση SO_3^{2-} .



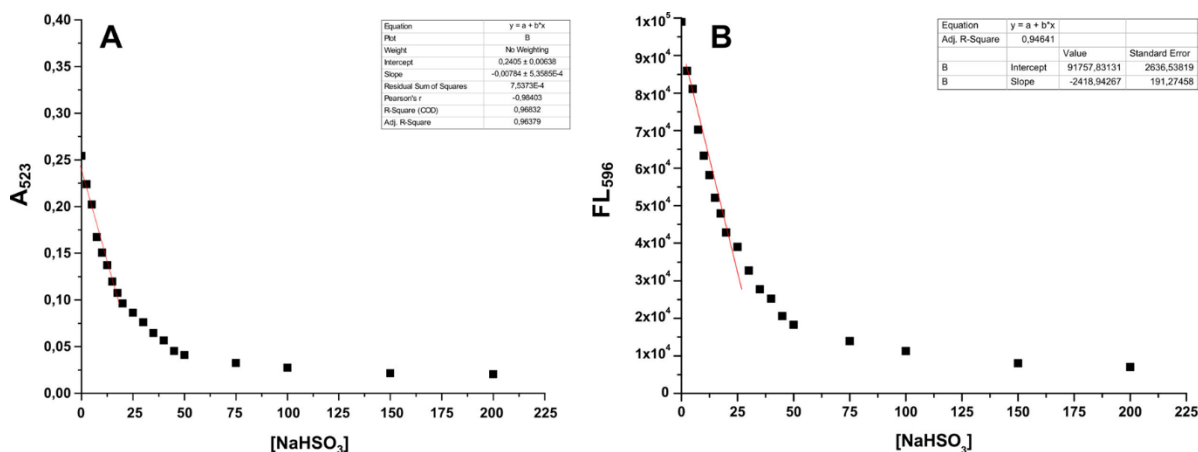
Εικόνα 68: Α) Απόκριση του σήματος απορρόφησης στο A_{523} παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης Na_2SO_3 (Β) Απόκριση του σήματος φθορισμού στα FL_{596} της ένωσης **17** κατόπιν διέγερσης στα 525 nm, παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης Na_2SO_3 σε θερμοκρασία 25 $^\circ\text{C}$ και step 2, ExBw: 2,EmBw: 2.

Προκειμένου τώρα, να παρακολουθήσουμε την απόκριση της ένωσης **17** έναντι των όξινων θειωδών (HSO_3^-) ανιόντων πραγματοποιήθηκαν πειράματα τιτλοδότησης μέσω φασματοσκοπίας ορατού υπεριώδους και φθορισμού. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 69 A** η ένωση **17** σε PBS (10 mM pH 7.4) κατόπιν σταδιακής προσθήκης όξινων θειωδών από διαλύματα συγκέντρωσης 100 μM (εώς 20.0 eq) παρατηρήθηκε μια διακριτή μείωση της απορρόφησης. Στη συνέχεια, αξιολογήσαμε την απόκριση της ένωσης **17** μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού κατόπιν διέγερσης στα 525 nm και με σταδιακής προσθήκη όξινων θειωδών από διαλύματα συγκέντρωσης 100 μM (εώς 20.0 eq). Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 69 B** καταγράφηκε μια αξιοσημείωτη μείωση του φάσματος φθορισμού στα 600 nm ~8 φορές.



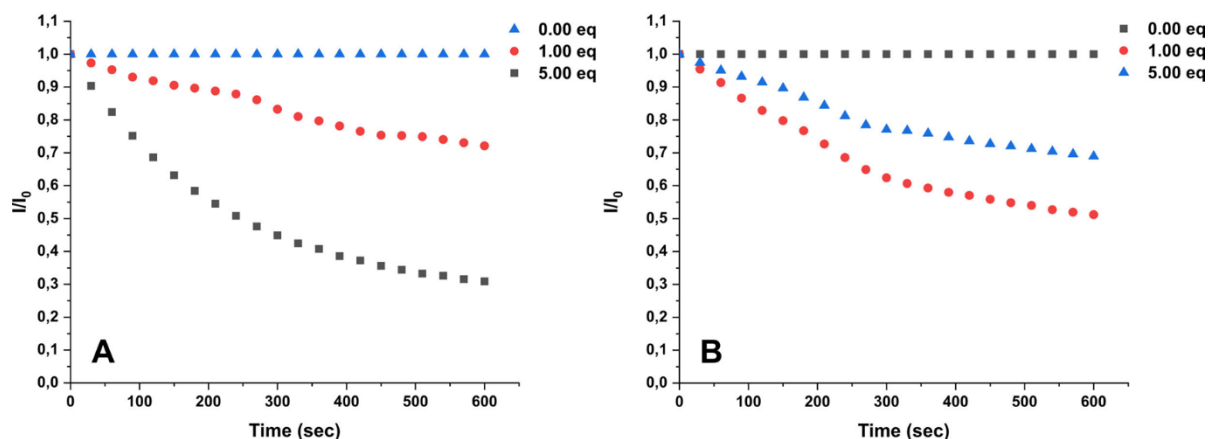
Εικόνα 69: Α) Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 17 (10 μM) σε PBS (10 mM, pH 7.4). παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης NaHSO_3 (Β) Φάσματα φθορισμού της ένωσης 17 (10 μM) σε PBS (10 mM, pH 7.4). παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης NaHSO_3 κατόπιν διέγερσης στα 525 nm, σε θερμοκρασία 25 $^\circ\text{C}$ και step 2, ExBw: 2, EmBw: 2.

Όμοια με την προηγούμενη περίπτωση παρουσιάζουν εξαιρετική γραμμικότητα (0.97 και 0.95 αντίστοιχα). Και το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε ίσο με 0,005818 mM με φασματοσκοπία φθορισμού υποδεικνύοντας ότι η ένωση διαθέτει υψηλή ευαισθησία στην υπερέκφραση HSO_3^- .



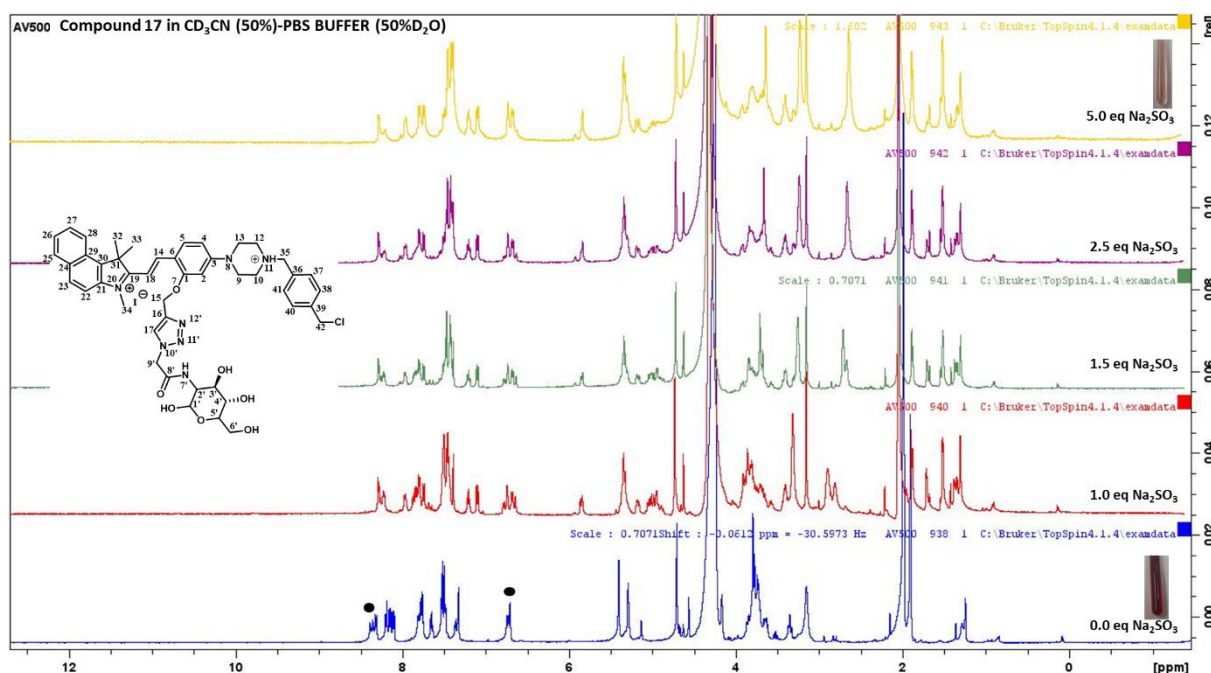
Εικόνα 70: Α) Απόκριση του σήματος απορρόφησης στο A_{523} παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης NaHSO_3 (Β) Απόκριση του σήματος φθορισμού στα FL_{596} της ένωσης 17 κατόπιν διέγερσης στα 525 nm, παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης NaHSO_3 σε θερμοκρασία 25 $^\circ\text{C}$ και step 2, ExBw: 2, EmBw: 2.

Προκειμένου να αξιολογήσουμε τον ρυθμό απόκρισης της ένωσης 17 παρουσία SO_3^{2-} πραγματοποιήθηκαν πειράματα κινητικής παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναλύτη (0.0, 1.0 και 5.0 ισοδυνάμων), τόσο με φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους (Εικόνα 71 Α) όσο και με φασματοσκοπία φθορισμού (Εικόνα 71 Β).



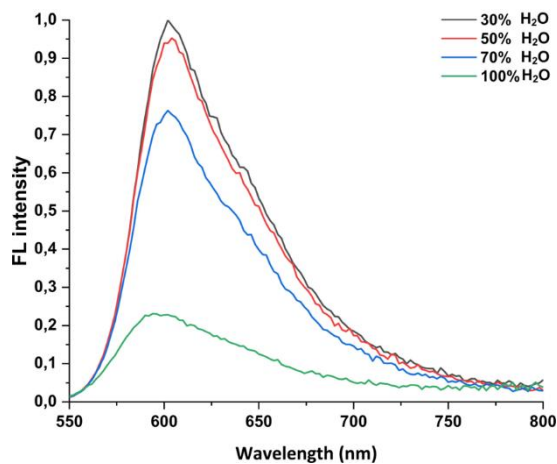
Εικόνα 71: Α) υπ-νίς κινητική μελέτη της ένωσης 17 (10 μM σε PBS 10 mM, pH 7.4) παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης Na_2SO_3 Β) FL κινητική μελέτη της ένωσης 17 (10 μM σε PBS 10 mM, pH 7.4) παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης Na_2SO_3 με λ_{em} 600 nm, σε θερμοκρασία 25 $^{\circ}\text{C}$.

Για να μπορούμε να κάνουμε μία υπόθεση για την θέση προσβολής των θειωδών ανιόντων στην δομή της ένωσης πραγματοποιήσαμε πειράματα τιτλοδότησης με φασματοσκοπία NMR. Πιο συγκεκριμένα σε διάλυμα της ένωσης σε δευτεριωμένο MeCN και δευτεριωμένο υδατικό διάλυμα PBS BUFFER 1/1 v/v, προστέθηκαν σταδιακά 1.0, 1.5, 2.5, 5.0 ισοδύναμα Na_2SO_3 και λήφθηκαν τα πρωτονιακά φάσματα NMR (CD_3CN (50%)-PBS BUFFER (50% D_2O) (500 MHz, 25 $^{\circ}\text{C}$). Αναλυτικότερα αρχικά λυοφιλώσαμε 250 μL από το buffer (διάλυμα σταθερού pH 7.4, 10 mM) και τα επαναδιαλύσαμε σε δευτεριωμένο νερό. Αργότερα προσθέσαμε 250 μL δευτεριωμένου ακετονιτριλίου ώστε ο τελικός όγκος να είναι 500 μL , όγκος κατάλληλος για την λήψη φάσματος NMR. Ακολούθησε διαλυτοποίηση της ουσίας και λήψη του πρώτου φάσματος. Στη συνέχεια προσθέσαμε κατάλληλο όγκο Na_2SO_3 από διάλυμα σταθερής συγκέντρωσης 100 mM διαλυμένο σε δευτεριωμένο ακετονιτρίλιο και δευτεριωμένο νερό 1/1, και λάβαμε το δεύτερο φάσμα. Προσθήκης κατάλληλης συγκέντρωσης Na_2SO_3 στο ίδιο δείγμα οδήγησε στα επόμενα φάσματα. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε χρωματική αλλαγή του δείγματος από κόκκινο σε αχνό ροζ. Το φάσμα της ένωσης με προσθήκη Na_2SO_3 άλλαξε δραστικά. Καθοδηγούμενοι από βιβλιογραφικές αναφορές [108], όπου αναφέρουν ότι τα ιόντα αυτά προσβάλλουν τα βινυλικά πρωτόνια εστιάσαμε την προσοχή μας στα πρωτόνια 14 και 18, που έχουν σημειωθεί με κουκίδες στην **Εικόνα 72**. Παρατηρούμε ότι με την πρώτη ακόμη προσθήκη Na_2SO_3 τα πρωτόνια αυτά επηρεάζονται. Θα μπορούσαμε λοιπόν να υποθέσουμε ότι εκεί μπορεί να συμβαίνει αρχικά η προσβολή των θειωδών ιόντων όμως πιθανά ολόκληρη η ένωση να καταστρέφεται με τον καιρό, αφού η αλλαγή ολόκληρου του φάσματος είναι πολύ σημαντική.



Εικόνα 72: Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης **17** σε CD_3CN (50%)-PBS BUFFER (50% D_2O) (500 MHz, 25 °C).

Αργότερα ερευνήσαμε την ικανότητα της ένωσης **17** ανίχνευσης αλλαγών στην πολικότητα. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού σε κάποια ενδεικτικά δυαδικά συστήματα 1,4 διοξανίου-νερού (από 0% έως 70% 1,4 διοξάνιο), όπου η διηλεκτρική σταθερά (ϵ) ελαττώνεται. Βέβαια η μεταβολή δεν ήταν σημαντική (~ 1.06 φορές) και έτσι μπορούμε να συμπεράνουμε ότι δεν διαθέτει ευαισθησία σε αυτήν την περίπτωση.



Εικόνα 73: Α Φάσματα φθορισμού της ένωσης της ένωσης **17** (10 μM) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα διοξανίου-νερού κατόπιν διέγερσης στα 525 nm σε θερμοκρασία 25 °C και step 2, ExBw: 2, EmBw: 2.

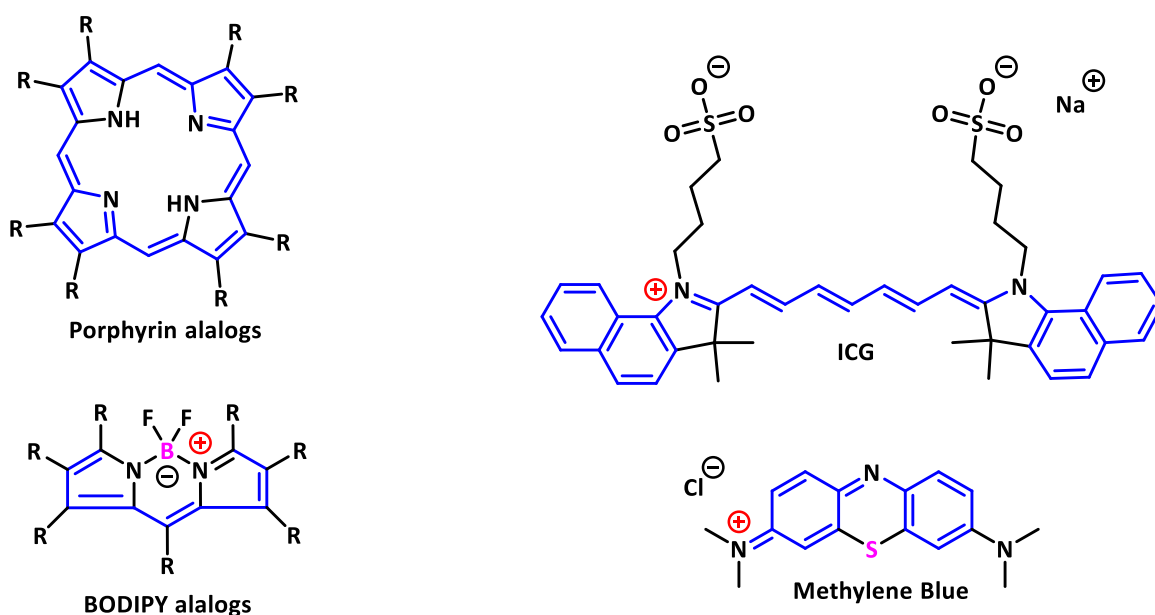
Τελικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι συνθέσαμε μια NIR χρωστική με καλές φωτοφυσικές ιδιότητες και καλή εκλεκτικότητα. Ανταποκρίνεται στις μεταβολές του ιξώδους λόγω της μείωσης της περιστροφής της σε τέτοια περιβάλλοντα. Επομένως, θα μπορούσε να χαρακτηριστεί η ένωση **17** ως μοριακός ρότορας και ως ένα εξαιρετικό διαγνωστικό εργαλείο έναντι ιξώδους.

2.3 Σχεδιασμός, σύνθεση και αξιολόγηση θεραπογνωστικών ενώσεων που στοχεύουν τα μιτοχόνδρια των καρκινικών κυττάρων και ανταποκρίνονται σε μεταβολές του ιζώδους, αυξάνοντας την ένταση φθορισμού τους

Στην συνέχεια τέθηκε στο προσκήνιο η ανάπτυξη ανιχνευτών που να έχουν διττό ρόλο: διάγνωσης και θεραπείας. Αυτό θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί είτε συνδέοντας στον ανιχνευτή κάποιο κυτταροτοξικό φάρμακο, είτε μετατρέποντας τον ίδιο τον ανιχνευτή σε φάρμακο. Στην πρώτη περίπτωση, τα ήδη υπάρχοντα φάρμακα τροποποιούνται προς σχηματισμό προφαρμάκων, για να βελτιωθούν οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες τους, ενώ ταυτόχρονα γίνεται και σύνδεση με κάποιον παράγοντα απεικόνισης για οπτικοποίηση της μεθόδου [109]. Στην δεύτερη περίπτωση, την οποία και επιλέξαμε, ο παράγοντας απεικόνισης διαθέτει ιδιότητες φωτοευαισθητοποιητή και μπορεί να προκαλέσει κυτταροτοξικότητα ύστερα από ακτινοβολήση σε κατάλληλο μήκος κύματος. Μάλιστα, μέχρι σήμερα ο FDA (Food and Drug Administration) έχει εγκρίνει τη χρήση δυο εξ' αυτών των ενώσεων (Methylene Blue και Indocyanine Green) [12, 13].

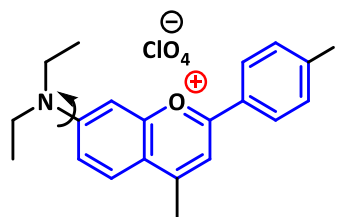
Έτσι συνθέσαμε μία νέα χρωστική που να είναι ενεργή στην φωτοδυναμική θεραπεία. Οι περισσότεροι φωτοευαισθητοποιητές δομικά έχουν, αν όχι όλα, κάποια από τα εξής χαρακτηριστικά:

1. εκτεταμένη συζυγία,
2. θετικό φορτίο σε ηλεκτρονιόφιλο άτομο που συμμετέχει στην συζυγία,
3. ύπαρξη κάποιου βαρέος ατόμου που επαναπροσαρμόζει την κινητική τριπλής κατάσταση (ενδομοριακό φαινόμενο βαρέος ατόμου, intramolecular heavy-atom effect)(Εικόνα 74) [110]



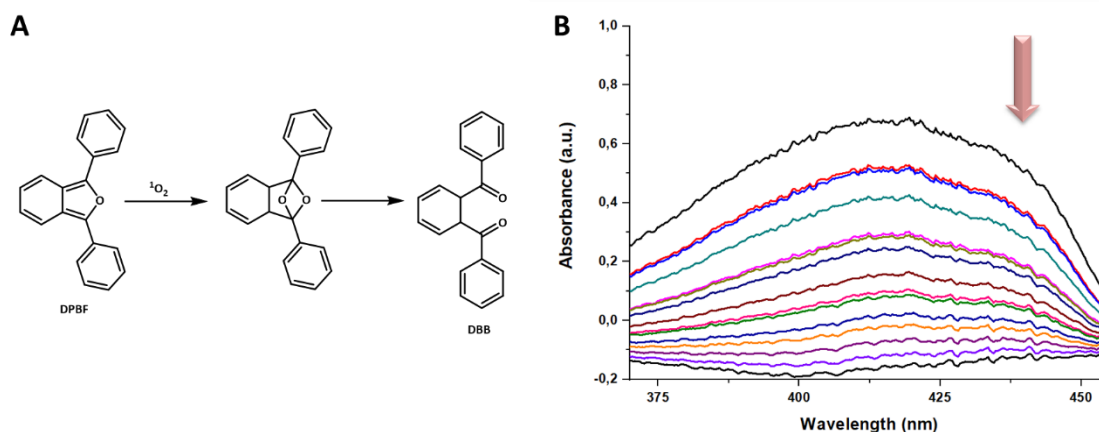
Εικόνα 74: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα φωτοευαισθητοποιητών. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται η συζυγία, με κόκκινο το θετικό φορτίο και με μωβ το βαρύ άτομο [69].

Η χρωστική που συνθέσαμε θα μπορούσε να καταταγεί στα άλατα φλαβιλίου. Διαθέτει και τα τρία χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν παραπάνω και είναι ενεργή στην φωτοδυναμική θεραπεία.



Εικόνα 75: Παρουσίαση της δομής της νεοσυντεθειμένης χρωστικής. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται η συζυγία, με κόκκινο το θετικό φορτίο και με μωβ το βαρύ άτομο.

Η ικανότητά της να παράγει μετά από ακτινοβολήση δραστικές ρίζες μονήρους οξυγόνου ελέγχθηκε με έναν ανιχνευτή, ο οποίος μεταβάλλει την δομή του και κατ' επέκταση το φάσμα απορρόφησής του μετά από αλληλεπίδραση με το $^1\text{O}_2$. Τα παράγωγα φουρανίου όπως το 2,5-διφαινυλ-3,4-ισοβενζοφουράνιο (1,3-Diphenylisobenzofuran, DPBF) ή το 2,5-διμεθυλφουράνιο, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως ανιχνευτές $^1\text{O}_2$ από τη δεκαετία του '70. Είναι πλεονεκτικές χημικές «παγίδες» του $^1\text{O}_2$ επειδή μπορούν να ποσοτικοποιηθούν με τη χρήση συνηθισμένων αναλυτικών τεχνικών όπως η φασματοφωτομετρία ή η αέρια χρωματογραφία, αντιδρούν με το $^1\text{O}_2$ κυρίως μέσω ενός χημικού καναλιού για να σχηματίσουν οξιράνια με ελάχιστη ή μηδενική συμβολή φυσικής απόσβεσης, και η συνολική σταθερά ρυθμού σβέσης, k_q , δείχνει μια πολύ μέτρια εξάρτηση από το διαλύτη. Επιπλέον, τα φουράνια αντιδρούν ειδικά με το $^1\text{O}_2$ και έτσι είναι ιδανικά για την ανάπτυξη επιλεκτικών ανιχνευτών $^1\text{O}_2$ [111-113]. Μεταξύ λοιπόν άλλων, επιλέχθηκε σαν μόριο ανιχνευτής το 1,3-διφαινυλ-3,4-ισοβενζοφουράνιο (DPBF). Το DPBF εμφανίζει απορρόφηση στα 415 nm. Αυτό σημαίνει ότι η απορρόφηση της NIR χρωστικής και του DPBF δεν αλληλεπικαλύπτονται και είναι εφικτή η παρακολούθηση της αντίδρασης φασματοφωτομετρικά παρατηρώντας τη μείωση στην κορυφή απορρόφησης του DPBF στα 415 nm ως συνάρτηση του μήκους κύματος σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα ακτινοβολίας. Αυτός αποτέλεσε και τον κύριο λόγο επιλογής αυτού του αντιδραστηρίου. Συμπληρωματικά διαθέτει καλή διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες και δεν απορροφά στο μήκος κύματος της πηγής ακτινοβολίας που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα (πηγή laser στα 520 nm).



Εικόνα 76: Α) Αντίδραση του DPBF με το $^1\text{O}_2$. Β) Παράδειγμα απεικόνισης του φάσματος του DPBF με το $^1\text{O}_2$. Παρατηρούμε ότι καθώς αντιδρούν η απορρόφηση στα 415 nm μειώνεται.

Τα επόμενα τρία θεραπευγνωστικά μόρια που θα παρουσιαστούν, στοχεύουν τα μιτοχόνδρια των κυττάρων. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν το βασικό υποκυτταρικό οργάνο των κυττάρων που να εμπλέκεται στις διεργασίες μεταβολισμού τους. Διαδραματίζουν πρωταρχικό ρόλο στη φυσιολογία των κυττάρων καθώς αποτελούν το ενεργειακό κέντρο των ζωντανών οργανισμών και παράγουν την πλειονότητα του ATP που απαιτείται για πολυάριθμες βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού και της διαίρεσης των κυττάρων, καθώς επίσης και της σύνθεσης διάφορων βιομορίων. Λειτουργούν ως κεντρικός κόμβος των μονοπατιών, του καταβολισμού (η διάσπαση των

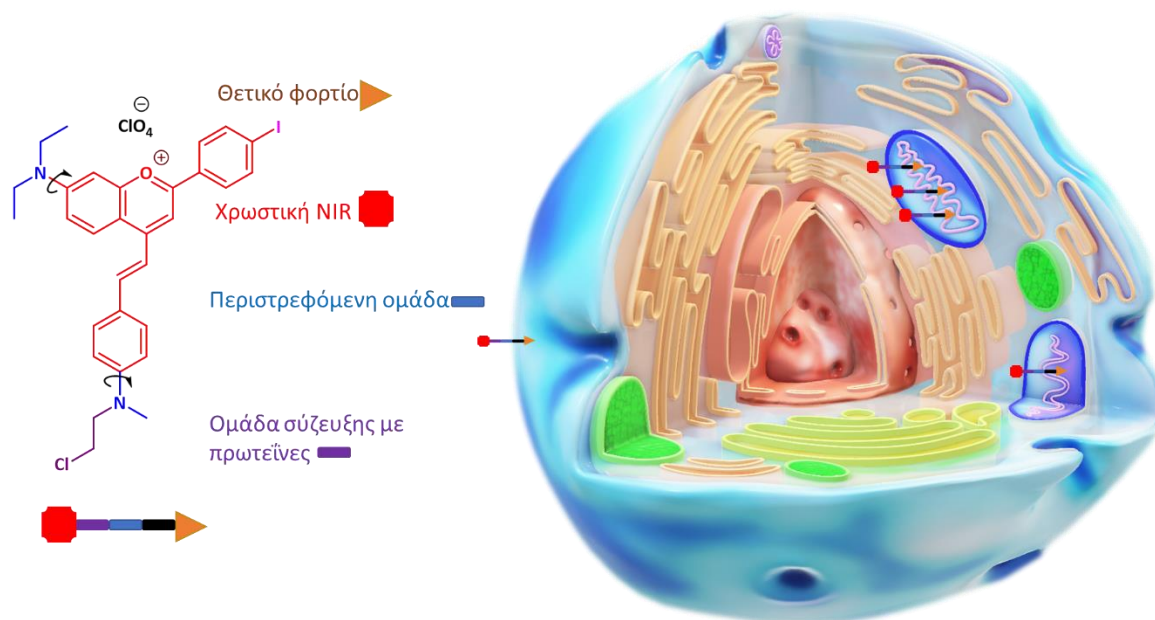
μεγάλων μακρομορίων για την παραγωγή ενέργειας) και του αναβολισμού (παραγωγή μεγάλων μακρομορίων από μικρά μεταβολικά ενδιάμεσα που χρησιμοποιούν ενέργεια) [114]. Έχει αποδεχτεί πως αρκετά μιτοχονδριακά μονοπάτια συνδέονται άμεσα με τις μεταβολικές διαταραχές, τον καρκίνο και τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες [115-117]. Σε περίπτωση πάθησης τα μιτοχόνδρια πρέπει να αλλάξουν τις βιοενεργειακές και βιοσυνθετικές τους λειτουργίες για να καλύψουν τις μεταβολικές απαιτήσεις του κυττάρου. Επιπλέον, για να διασφαλιστεί ότι έχουν την ικανότητα να ανταποκρίνονται στις μεταβολικές απαιτήσεις του κυττάρου, τα μιτοχόνδρια πρέπει να «επικοινωνούν» συνεχώς για την καταλληλότητά τους με το υπόλοιπο κύτταρο. Έτσι παράγουν μεταβολίτες που μπορούν να αξιοποιηθούν για την διάγνωση της πάθησης π.χ., τα ROS.

Κατά τη διάρκεια της μιτοχονδριακής αναπνοής, οι αντλίες πρωτονίων στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη μεταφέρουν πρωτόνια στον μιτοχονδριακό διαμεμβρανικό χώρο, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός πολύ αρνητικού μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού δυναμικού (-180 mV). Εμπνευσμένα από αυτήν τη διαδικασία, πολλά αποπροσανατολισμένα λιπόφιλα κατιόντα έχουν αποδειχθεί ότι εμφανίζουν δυνατότητες στόχευσης μιτοχονδρίων.

2.3.1 Συνθετική πορεία της διαγνωστικής ένωσης 25

Διατηρώντας σαν σημείο αναφοράς την ανταπόκριση του ιζώδους συνθέσαμε μια νέα χρωστική με καλές φωτοφυσικές ιδιότητες και στη συνέχεια μετά από μια αντίδραση συμπύκνωσης τύπου Knoevenagel συνδέθηκε με ένα μόριο που έχει δυνατότητα περιστροφής συνεπώς και ανταπόκρισης σε μεταβολές του ιζώδους, και ένα τμήμα όπου μπορεί να αλληλοεπιδρά ομοιοπολικά με πρωτεΐνες. Πιο συγκεκριμένα η χρωστική διαθέτει:

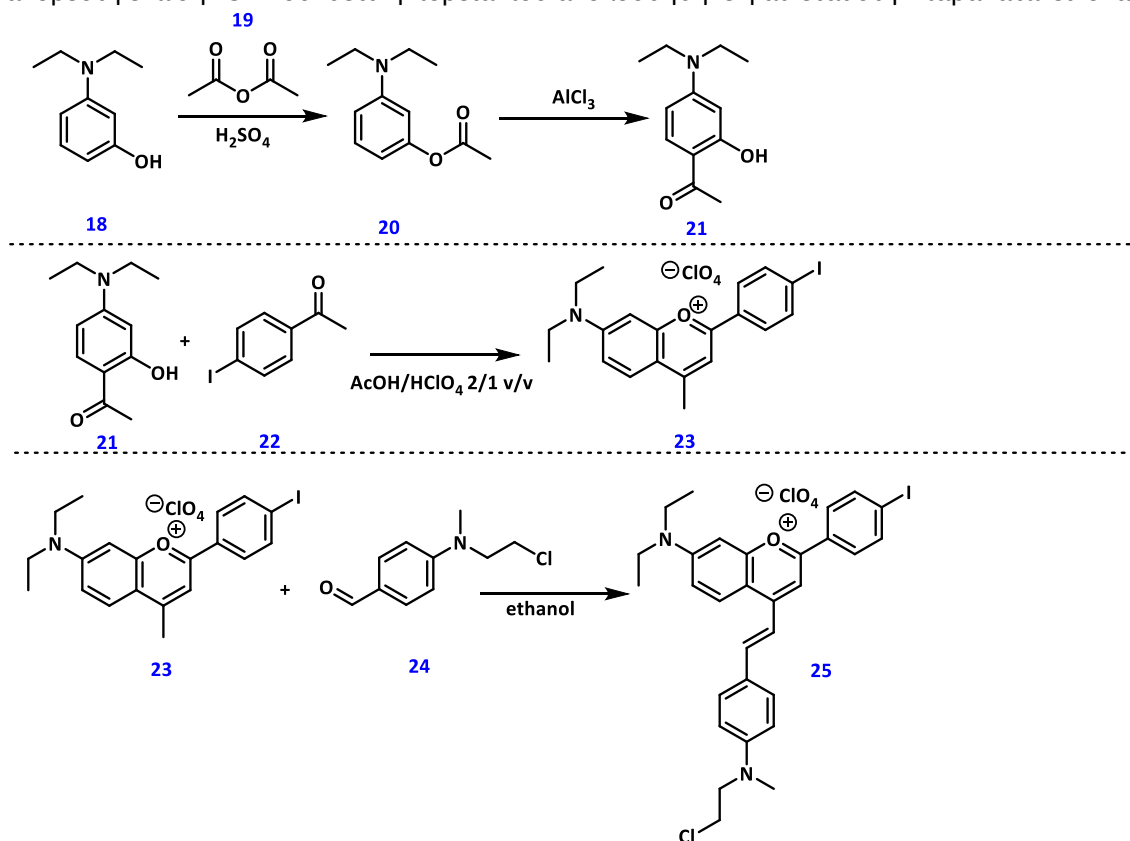
1. φθορίζων, φωτοδυναμικά ενεργό μόριο και θετικά φορτισμένο σκελετό,
2. στοιχείο για ομοιοπολική αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες,
3. μόρια με ικανότητα περιστροφής που δύναται να υποβοηθούν την απόκριση σε μεταβολές του ιζώδους.



Εικόνα 77: Σχηματική αναπαράσταση των δομικών συστατικών και του προτεινόμενου τρόπου δράσης της διαγνωστικής ένωσης 25.

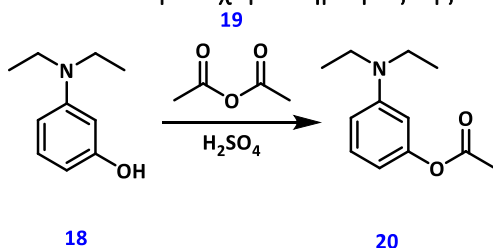
Ξεκινώντας από 3-διαιθυλάμινο φαινόλη ως αρχικό υπόστρωμα, πραγματοποιείται αντίδραση ακετυλίωσης υπό όξινες συνθήκες [118], προς σχηματισμό του ακετυλιωμένου παραγώγου της 3-διαιθυλάμινο φαινόλης (Ένωση **20**). Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα μια ενδομοριακή μετάθεση Fries [119], προς σχηματισμό της ένωσης **21**. Για να ολοκληρωθεί η σύνθεση του

χρωμοφόρου παράγοντα πραγματοποιείται μια κυκλοποίηση μεταξύ δύο ακετοφαινονών [120]. Τέλος πραγματοποιείται μία αντίδραση τύπου Knoevenagel μεταξύ του χρωμοφόρου πυρήνα και της 4-((2-χλωροαιθυλ)(μέθυλ)άμινο)βενζαλδεΐδης [121, 122] προκειμένου να σχηματιστεί η α, β ακόρεστη ένωση **25**. Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 78: Πειραματική πορεία σύνθεσης της θεραπευγνωστικής ένωσης **25**.

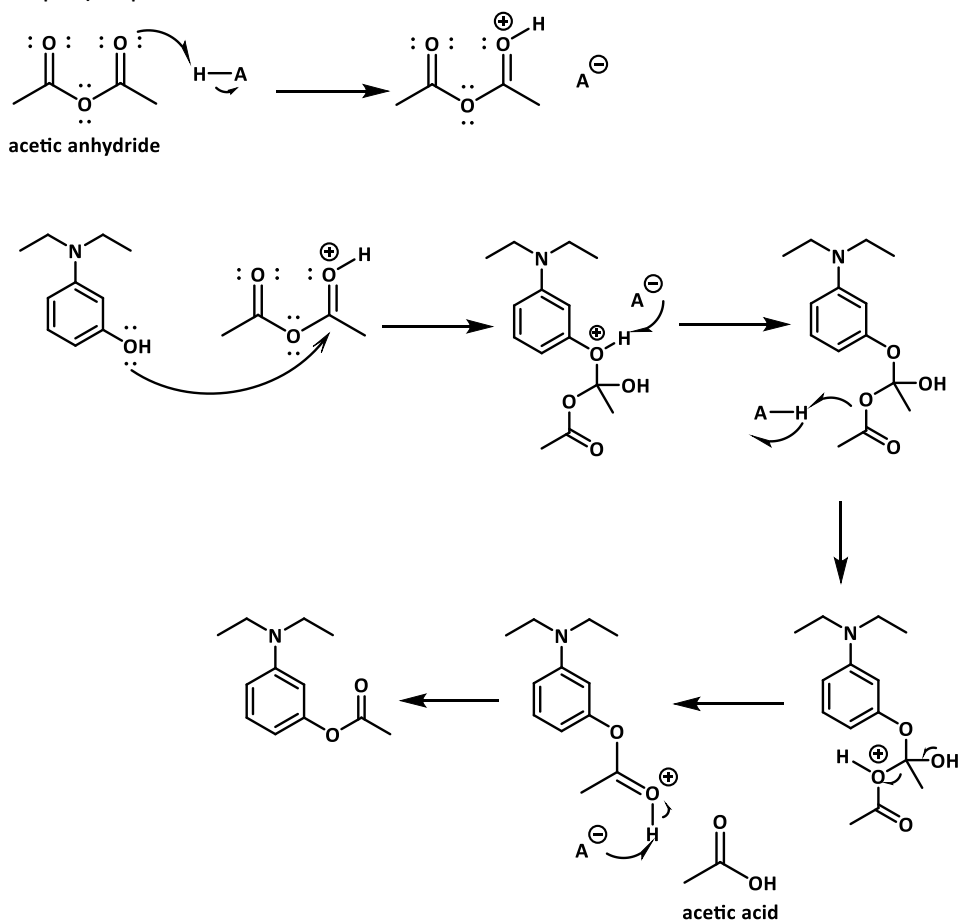
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης **20**



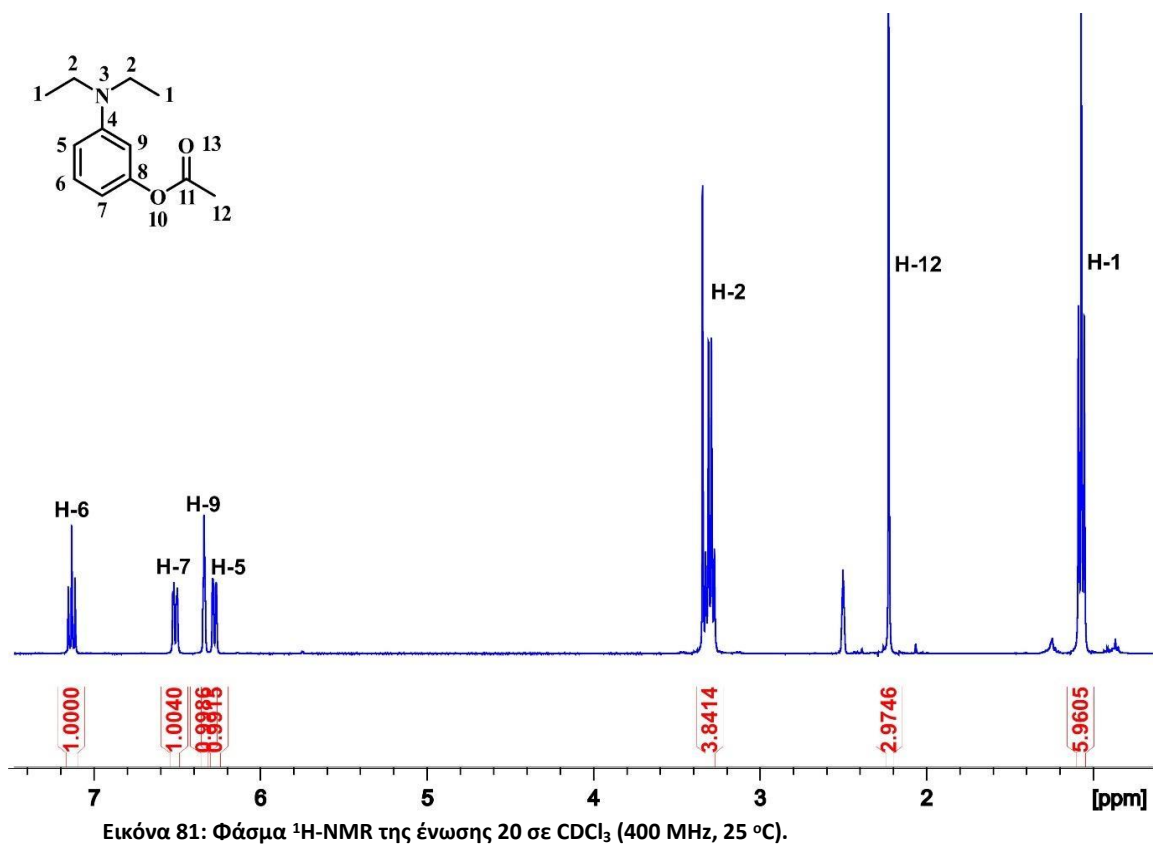
Εικόνα 79: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης **20** [14].

Η 3-διαιθυλάμινο φαινόλη (10 g, 60.52 mmol), διαλύθηκε σε οξικό ανυδρίτη (17.2 mL, 181.56 mmol) υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Επιπλέον προστέθηκε καταλυτική ποσότητα θεικού οξέος (μερικές σταγόνες) και το μίγμα θερμάνθηκε με αναρροή υπό κάθετο ψυκτήρα στους 120 °C για 1 ώρα. Η πρόοδος της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με χρήση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας-TLC σε σύστημα διαλυτών Hex / EtOAc (70:30 v/v), η οποία έδειξε το σχηματισμό ενός νέου, λιγότερου πολικού προϊόντος. Ακολούθησε προσθήκη νερού και το μίγμα εκχυλίστηκε με EtOAc. Η οργανική φάση εκχυλίστηκε με διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου (NaHCO₃). και τέθηκε υπό ξήρανση με θειικό νάτριο και απομάκρυνση του οξικού αιθυλεστέρα υπό κενό. Το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε απόσταξη υπό κενό για να δώσει την ένωση **20** ως καφέ-μωβ λάδι (11.41 g, 90%).

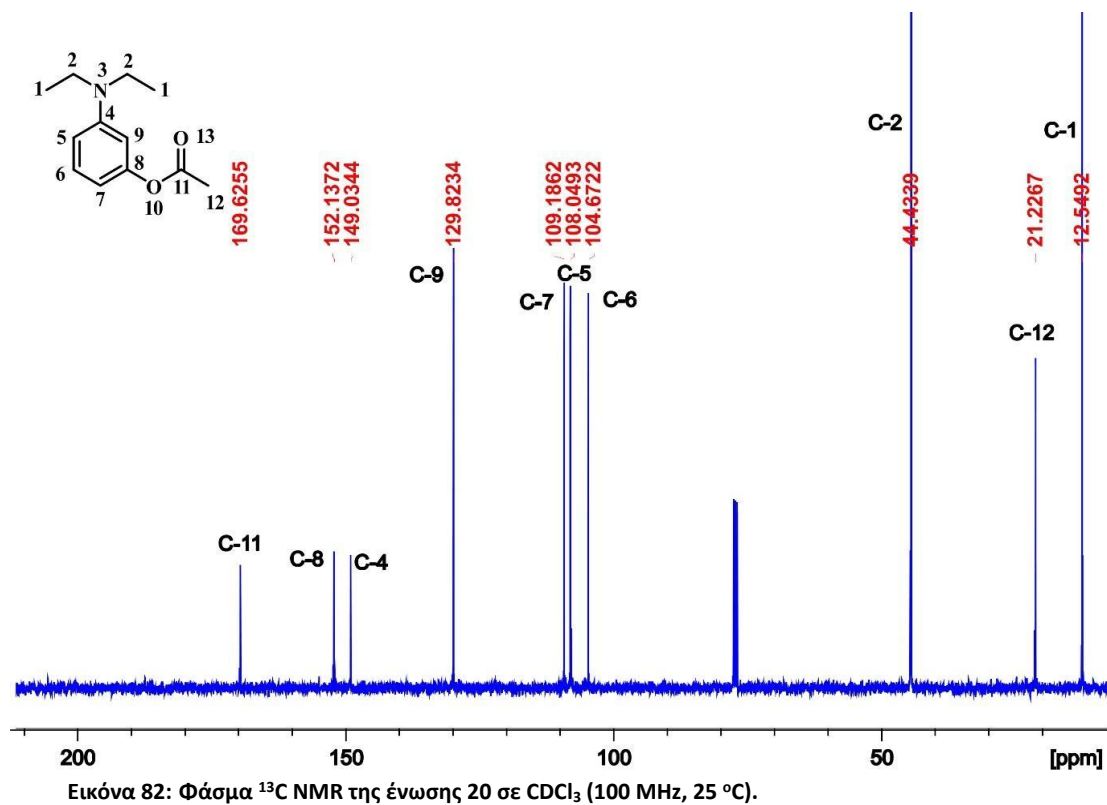
Η αντίδραση αυτή περιγράφει την μεταφορά μιας ακετυλομάδας από τον οξικό ανυδρίτη στην πυρηνόφιλη φαινολική υδροξυλομάδα. Οδηγεί στην παραγωγή του επιθυμητού εστέρα και ενός καρβοξυλικού οξέος. Ακολουθεί ο προτεινόμενος μηχανισμός και ο προτεινόμενος χαρακτηρισμός της ένωσης **20** με φασματοσκοπία NMR.



Εικόνα 80: Προτεινόμενος μηχανισμός για την αντίδραση ακετυλίωσης καταλυόμενη από οξύ [14].

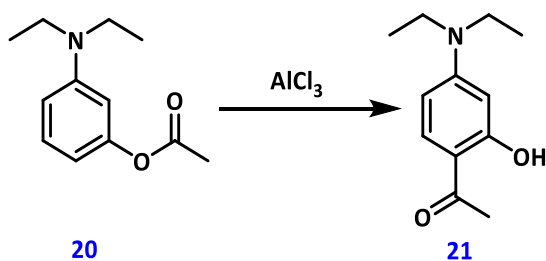


^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.17-7.09 (t, $J=7.9\text{Hz}$, 1H, H-6), 6.54-6.48 (d, $J=8.2\text{ Hz}$, 1H, H-7), 6.36-6.32 (s, 1H, H-9), 6.30-6.25 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H, H-5), 3.33-3.26 (dd, $J=6.8\text{Hz}$, $J=7.0\text{ Hz}$, 4H, H-2), 2.25-2.19 (s, 3H, H-12), 1.11-1.03 (t, $J=6.7\text{ Hz}$, 6H, H-1).



¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 162.6 (C-11), 152.1 (C-8), 149.0 (C-4), 129.8 (C-9), 109.2 (C-7), 108.0 (C-5), 104.7 (C-6), 44.4 (C-2), 21.2 (C-12), 12.5 (C-1).

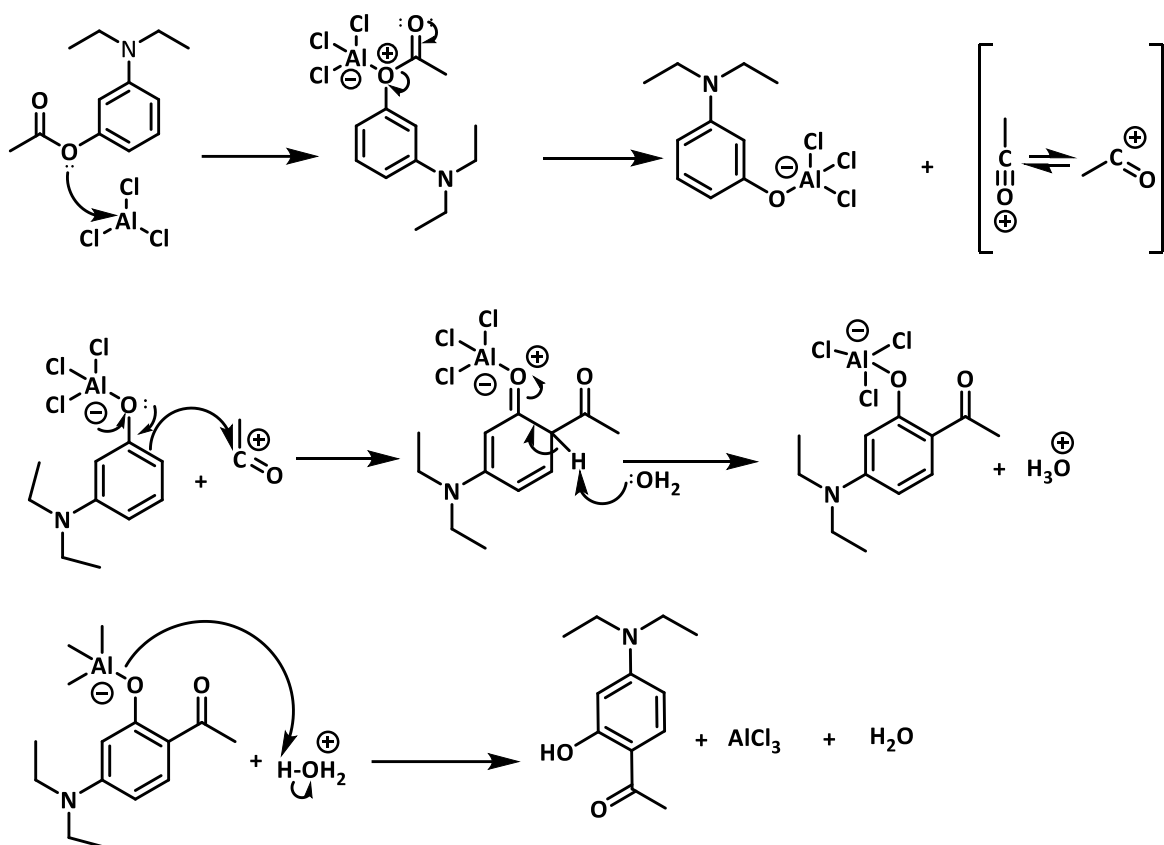
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 21



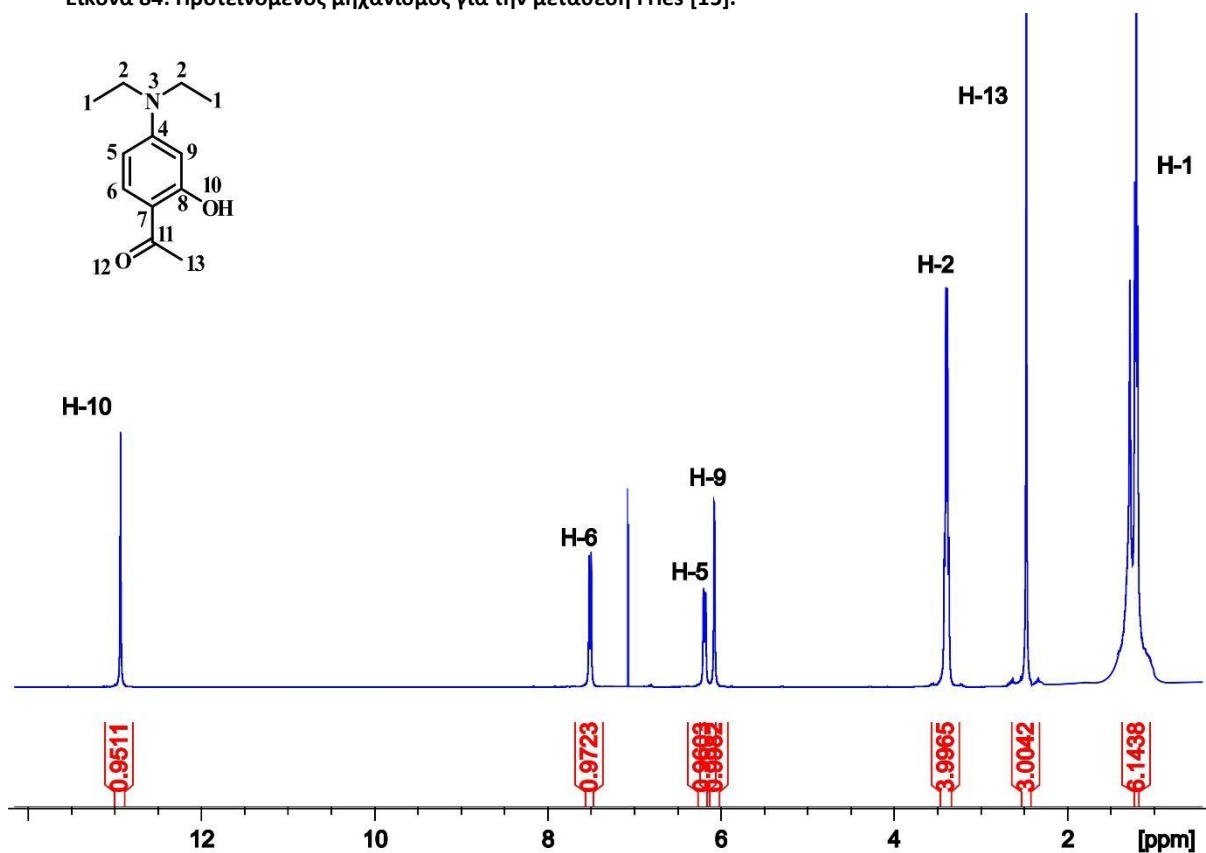
Εικόνα 83: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης **21** [15].

Σε δίλαμνη σφαιρική φιάλη προστέθηκαν η ένωση **20** (10.96 g, 0.0528 mol) και άνυδρο τριχλωριούχο αργίλιο (10.6 g, 0.0793 mol), υπό ατμόσφαιρα αζώτου και το μίγμα θερμάνθηκε με αναρροή υπό κάθετο ψυκτήρα στους 135 °C για 5 ώρες, απουσία διαλύτη. Κατά την πραγματοποίηση της αντίδρασης παράγονται όξινα αέρια, για την εξουδετέρωση των οποίων χρησιμοποιήθηκε ένα λάστιχο που από την μία πλευρά συνδεόταν με το άνω μέρος του ψυκτήρα και το κάτω μέρος ήταν τοποθετημένο σε κορεσμένο διάλυμα NaOH. TLC χρωματογραφία σε σύστημα διαλυτών Hex/EtOAc (70/30 v/v) έδειξε την πλήρη κατανάλωση της ένωσης **20** και τον σχηματισμό ενός πολικού προϊόντος. Μετά την επαναφορά του μίγματος στη θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκε προσεκτικά, υπό πάγο, περίσσεια ποσότητας παγωμένου νερού και αναδεύτηκε για ακόμη 1 ώρα στους 50 °C. Έπειτα, το μίγμα εκχυλίστηκε με EtOAc και η οργανική φάση ξηράνθηκε με θειικό νάτριο ενώ η περίσσεια διαλύτη εξατμίστηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης, όπου το αναμενόμενο προϊόν συλλέχθηκε στο κλάσμα 3% EtOAc / Hex, ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό αναδευτήρα και το προϊόν ξηράνθηκε υπό υψηλό κενό για να δώσει την ένωση **21** (6.4 g, 58%) ως υποκίτρινο στερεό.

Η αντίδραση αυτή καταλύεται από οξέα Brønsted ή Lewis όπως το AlCl_3 και μάλιστα σε περίσσεια της στοιχειομετρικής ποσότητας, αφού σχηματίζουν ενδιάμεσες ενώσεις τόσο με τα αντιδρώντα όσο και με τα προϊόντα. Το ενδιάμεσο που προκύπτει μετά την αλληλεπίδραση με το οξύ μπορεί να διασπαστεί για να σχηματίσει ένα ιόν ακυλίου, το οποίο προσβάλλει στην λιγότερο παρεμποδισμένη θέση. Μετά την υδρόλυση, το προϊόν απελευθερώνεται. Ακολουθεί ο προτεινόμενος μηχανισμός και ο προτεινόμενος χαρακτηρισμός της ένωσης **21** με φασματοσκοπία NMR.

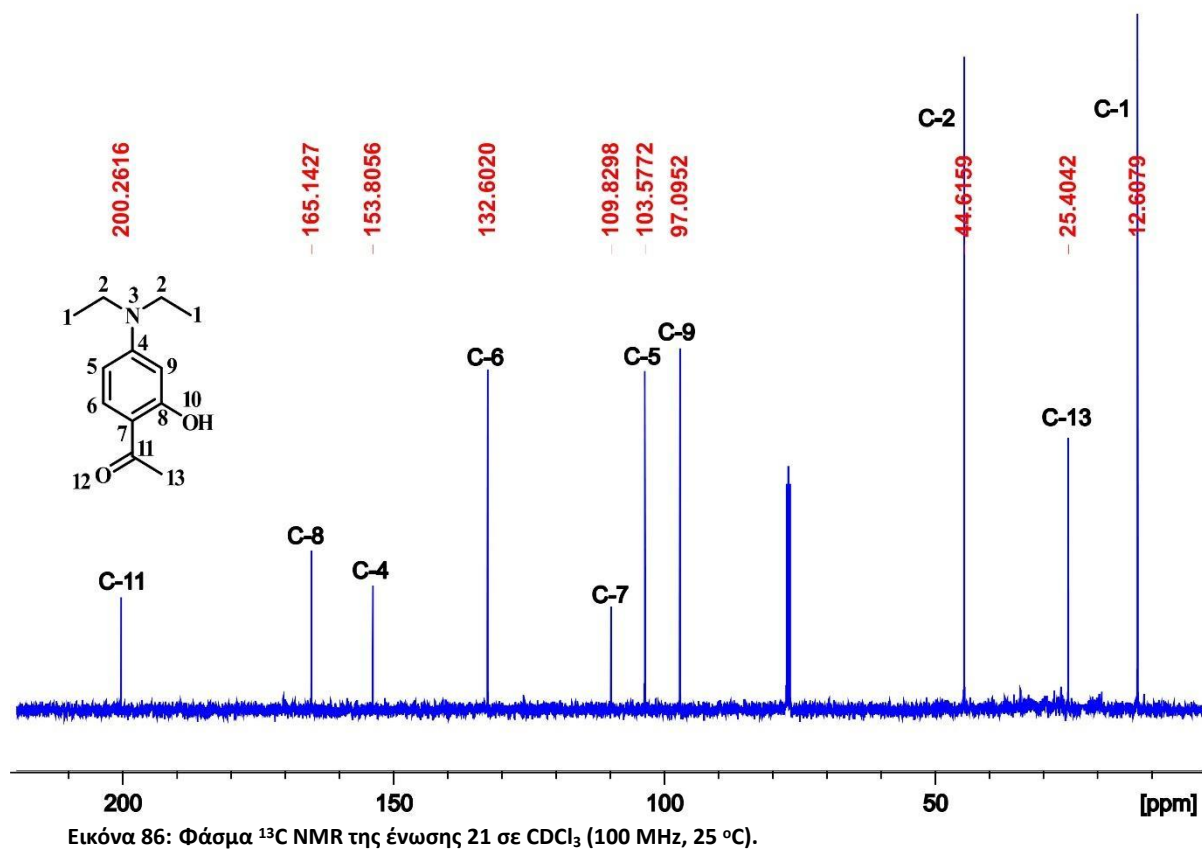


Εικόνα 84: Προτεινόμενος μηχανισμός για την μετάθεση Fries [15].



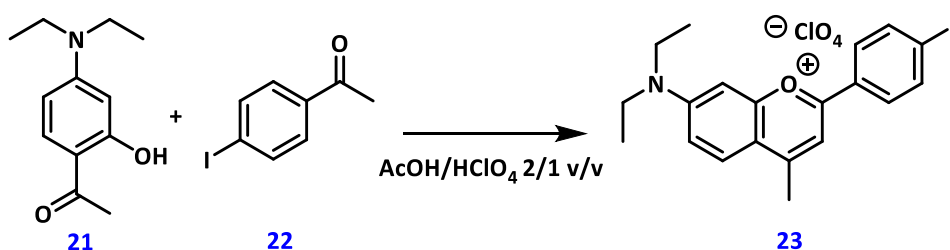
Εικόνα 85: Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 21 σε CDCl_3 (400 MHz, 25 °C).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 12.95-12.91 (s, 1H, H-10), 7.54-7.48 (d, $J=9.1$ Hz, 1H, H-6), 6.22-6.16 (dd, $J=9.02$ Hz, $J=1.75$ Hz, 1H, H-5), 6.08-6.06 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, H-9), 3.44-3.35 (dd, $J=7.2$ Hz, $J=7.0$ Hz, 4H, H-2), 2.51-2.44 (s, 3H, H-13), 1.24-1.16 (t, $J=7.0$ Hz, 6H, H-1).



^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 200.3 (C-11), 165.1 (C-8), 153.8 (C-4), 132.6 (C-6), 109.8 (C-7), 103.6 (C-5), 97.1 (C-9), 44.6 (C-2), 25.4 (C-13), 12.1 (C-1).

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 23



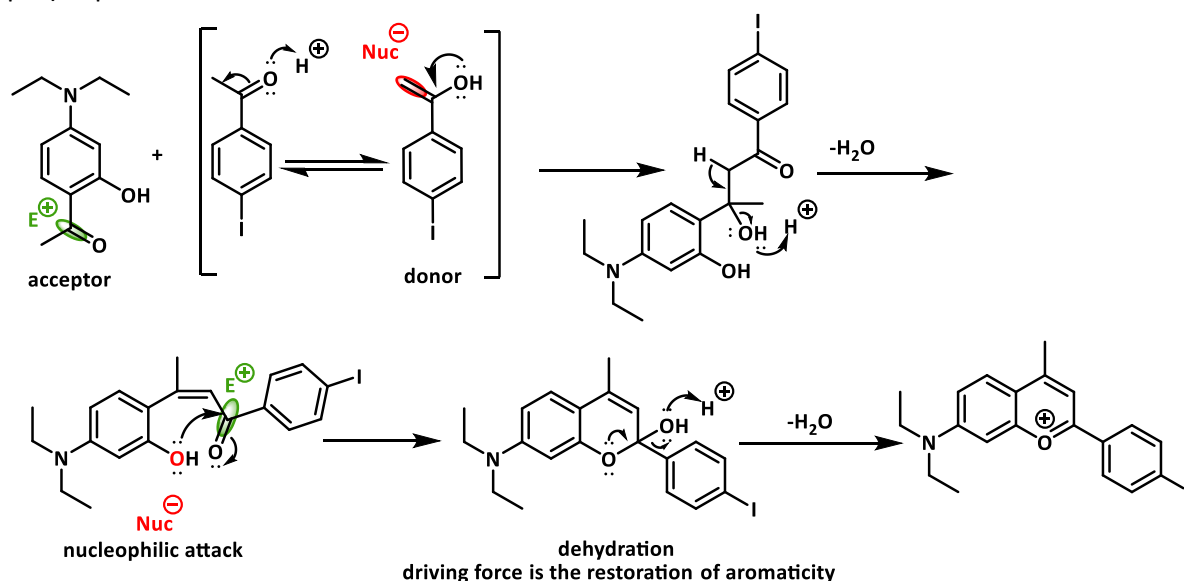
Εικόνα 87: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 23 [16].

Σε ένα διάλυμα της ένωσης **21** (50 mg, 0.241 mmol) σε οξικό οξύ (2 mL) προστέθηκε η 4-ιωδοακετοφαινόνη (59.35 mg, 0.241 mmol) και υπερχλωρικό οξύ (1 mL), και το μίγμα της αντίδρασης θερμάνθηκε με αναρροή υπό κάθετο ψυκτήρα στους 112 °C για 24 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολούθηθηκε με χρωματογραφία TLC σε σύστημα διαλυτών $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (5%, v/v) και παρατηρήθηκε σχηματισμός ενός νέου, έγχρωμου (μωβ), περισσότερο πολικού προϊόντος. Ακολούθησε ψύξη του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου, και προσθήκη περίσσειας νερού στο

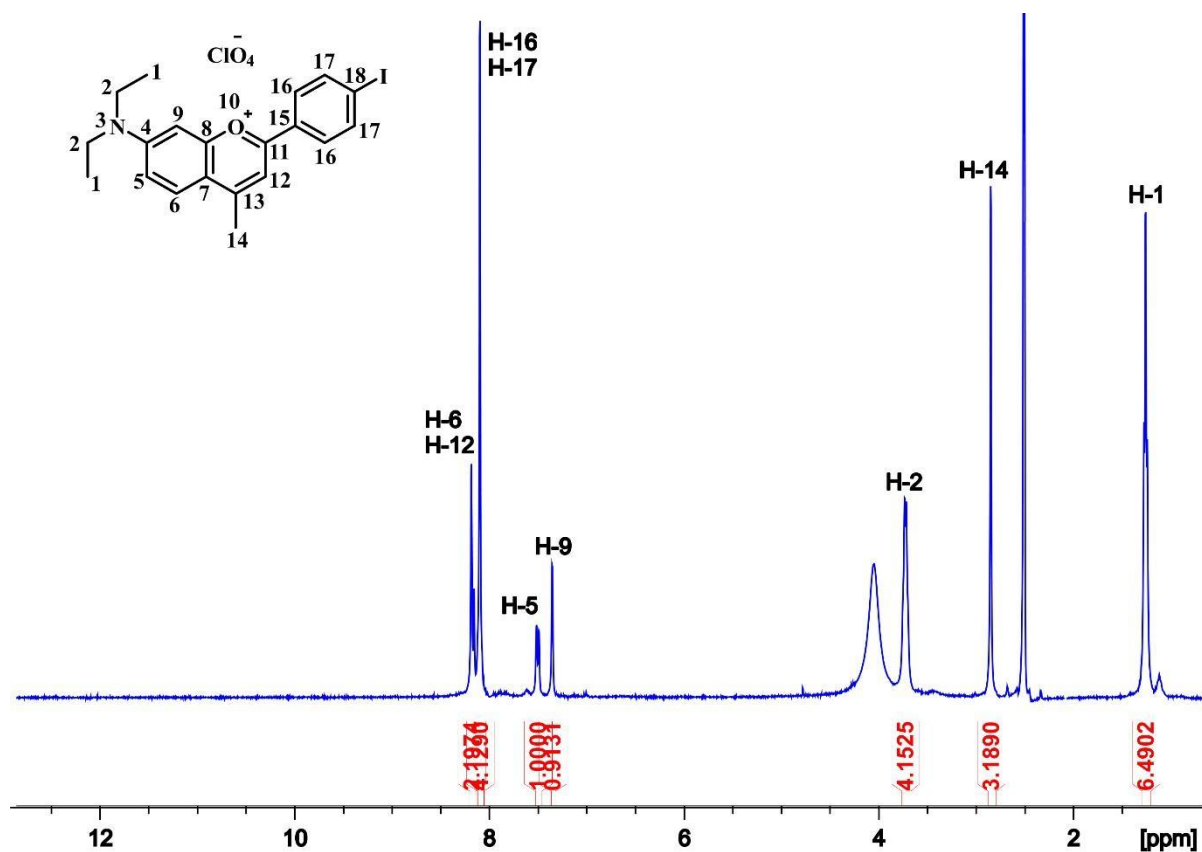
μίγμα με παράλληλη τοποθέτησή του σε πάγο. Το μωβ στερεό που σχηματίστηκε διηθήθηκε σε χωνί με ηθμό και έγιναν εκπλύσεις αυτού με διαιθυλιθέρα (Et₂O). Έπειτα, έγινε συλλογή του στερεού και ξήρανση αυτού για να δώσει την ένωση **23** ως μωβ στερεό (42.6 mg, 34%).

Η αντίδραση αυτή, καρβονυλικής συμπύκνωσης, προτείνεται ότι αποτελείται από δύο στάδια. Το πρώτο φαίνεται να ομοιάζει με μια προσθήκη τύπου Michael όπου η ένωση **21** αποτελεί τον δέκτη, με το ηλεκτρονιόφιλο άτομο άνθρακα του καρβονυλίου και η 4-ιωδοακετοφαινόνη αποτελεί τον δότη, με το πυρηνόφιλο άτομο άνθρακα του διπλού δεσμού της ταυτομερής της μορφής. Το στάδιο μετά την προσθήκη φαίνεται να ακολουθεί μια πυρηνόφιλη ενδομοριακή προσβολή που οδηγεί σε κυκλοποίηση συνοδευόμενη από απομάκρυνση ενός μορίου νερού (αφυδάτωση) με κινητήρια δύναμη την επανάκτηση της συζυγίας. Συνδυασμός αυτών των σταδίων μας οδηγεί να προτείνουμε ότι ο μηχανισμός αυτός ομοιάζει με την κυκλοποίηση Robinson.

Ακολουθεί ο προτεινόμενος μηχανισμός και ο προτεινόμενος χαρακτηρισμός της ένωσης **23** με φασματοσκοπία NMR.

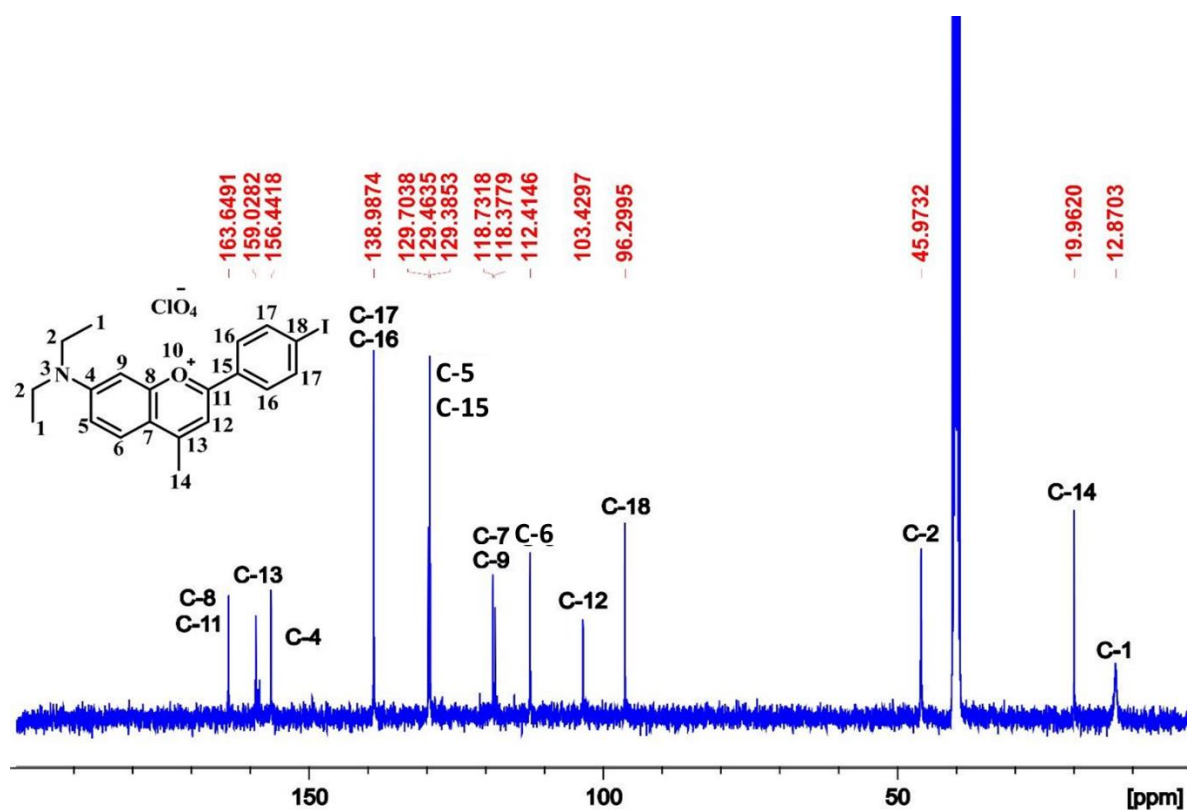


Εικόνα 88: Προτεινόμενος μηχανισμός για την κυκλοποίηση τύπου Robinson [16].



Εικόνα 89: Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης 23 σε DMSO-d₆ (400 MHz, 25 °C).

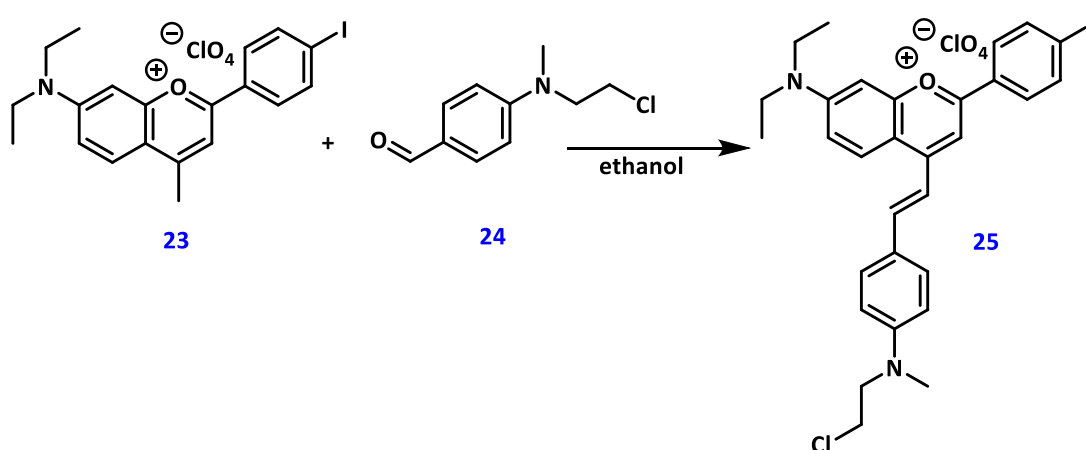
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 8.22-8.14 (m, 2H, H-6, H-12), 8.13-8.06 (s, 4H, H-16, H-17), 7.54-7.47 (dd, J=9.7 Hz, J=1.4 Hz, 1H, H-5), 7.38-7.32 (d, J=2.0 Hz, 1H, H-9), 3.77-3.66 (dd, J=6.7 Hz, J=6.0 Hz, 4H, H-2), 2.88-2.79 (s, 3H, H-14), 1.3-1.2 (t, J= 6.7 Hz, 6H, H-1).



Εικόνα 90: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 23 σε DMSO-d_6 (100 MHz, 25 °C).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 163.7 (C-8), 163.6 (C-11), 159.0 (C-13), 156.4 (C-4), 139.0 (C-17), 129.7 (C-16), 129.4 (C-5), 118.7 (C-7), 118.4 (C-9), 112.4 (C-6), 103.5 (C-12), 96.3 (C-18), 46.0 (C-2), 20.0 (C-14), 12.9 (C-1).

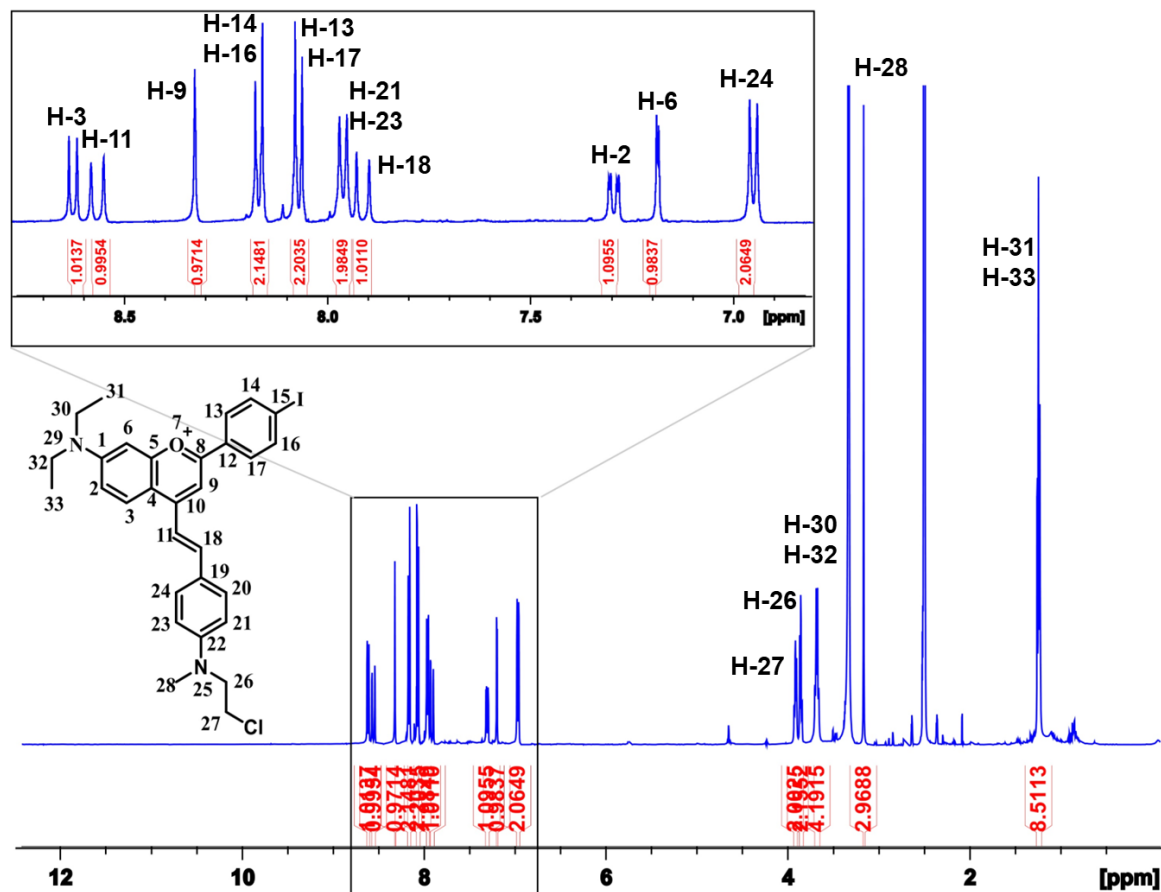
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 25



Εικόνα 91: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 25.

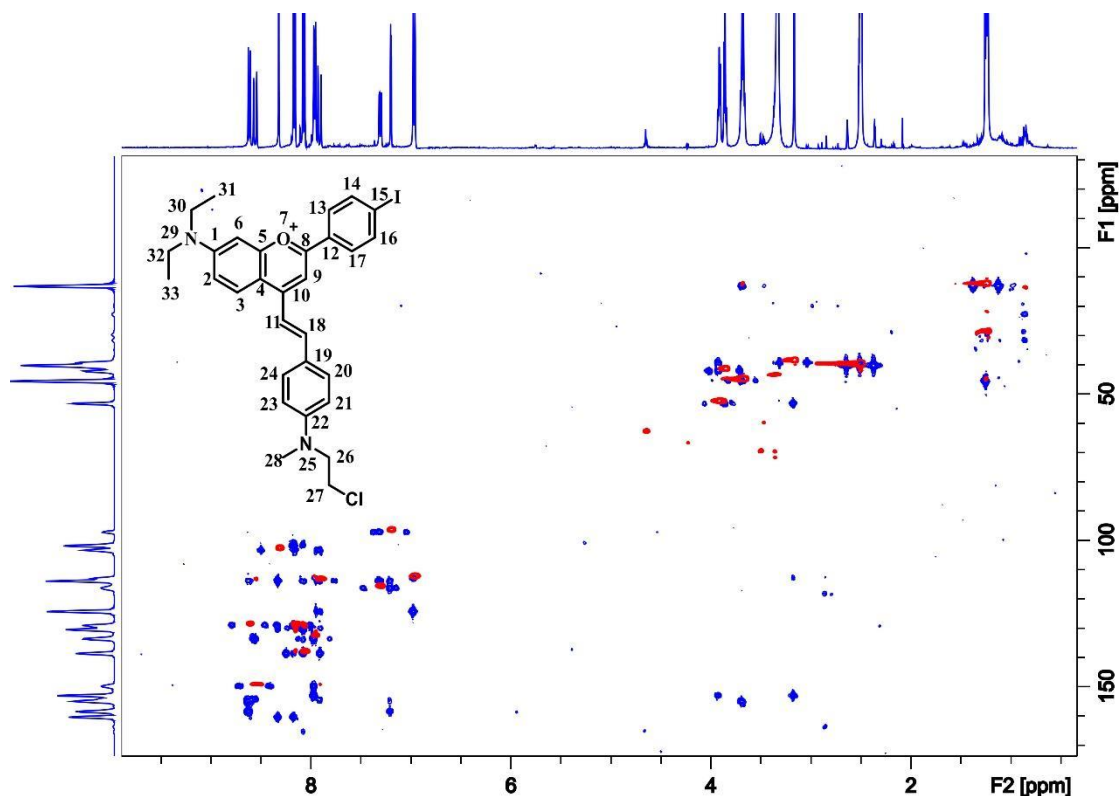
Προκειμένου να λάβει χώρα η συμπύκνωση της χρωστικής **23** και της 4-[(2-χλωροαιθυλ)μέθυλαμινό]βενζαλδεΐδης προς σχηματισμό της τελικής χρωστικής **25**, η χρωστική **23** (30 mg, 0.058 mmol) και η 4-[(2-χλωροαιθυλ)μέθυλαμινό]βενζαλδεΐδης (11.5 mg, 0.058 mmol), διαλύθηκαν σε αιθανόλη (2mL), και το μίγμα της αντίδρασης θερμάνθηκε με αναρροή για 24 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με TLC σε σύστημα διαλυτών $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (5%, v/v) και

παρατηρήθηκε σχηματισμός ενός νέου, έγχρωμου (μπλε), λίγο πιο άπολου προϊόντος, με ταυτόχρονη πλήρη κατανάλωση των αντιδρώντων. Έτσι η αιθανόλη εξατμίστηκε υπό κενό και το στερεό υποβλήθηκε σε καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης από 0% έως 4% MeOH / CH₂Cl₂, ώστε να λάβουμε το τελικό προϊόν (38 mg, 94%). Ακολουθεί ο προτεινόμενος χαρακτηρισμός της ένωσης **25** με φασματοσκοπία NMR και φασματομετρίας μάζας.



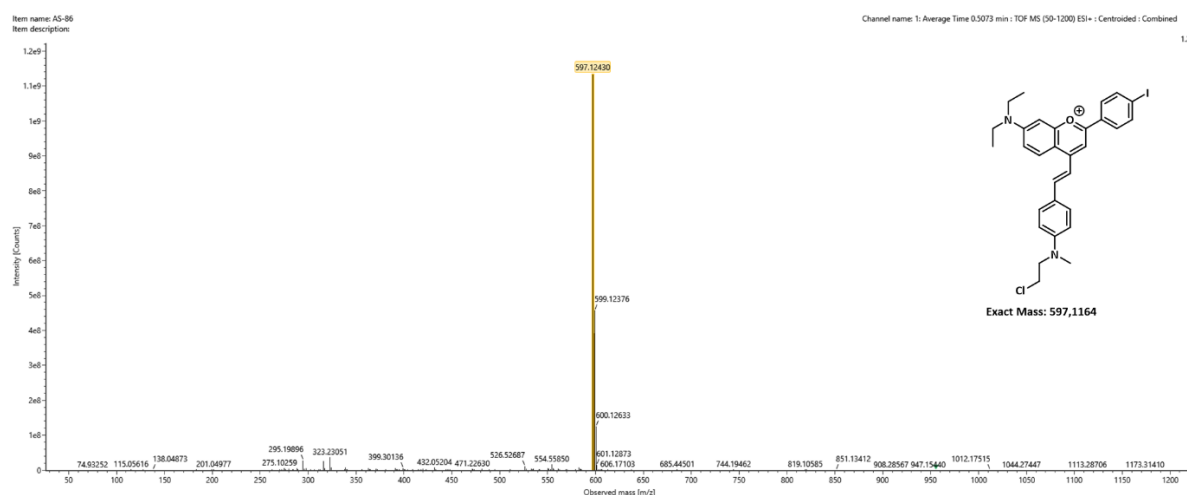
Εικόνα 92: Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης **25** σε DMSO-d₆ (500 MHz, 25 °C).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 8.63-8.60 (d, J=9.71 Hz, 1H, H-3), 8.58-8.53 (d, J=15.53Hz, 1H, H-11), 8.33-8.31 (s, 1H, H-9), 8.18-8.15 (dd, J=8.61 Hz, 2H, H-14, H-16), 8.08-8.05 (dd, J=8.61, 2H, H-13, H-17), 8.00-7.94 (d, J=9.01 Hz, 2H, H-21, H-23), 7.93-7.89 (d, J=15.53 Hz, 1H, H-18), 7.32-7.23 (dd, J=7.04 Hz, J=2.43 Hz, 1H, H-2), 7.21-7.19 (d, J=2.43 Hz, 1H, H-6), 6.98-6.95 (d, J=9.01 Hz, 2H, H-20, H-24), 3.94-3.89 (t, J=6.07 Hz, 2H, H-27), 3.88-3.83 (t, J=6.07 Hz, 2H, H-26), 3.71-3.64 (dd, J=7.04 Hz, 4H, H-30, H-32), 3.18-3.15 (s, 3H, H-28), 1.27-1.21 (t, J= 1.07 Hz, 8H, H-31, H-33).



Εικόνα 93: Υπέρθυση φασμάτων 2D ^1H - ^{13}C HSQC (κόκκινο)-HMBC (μπλε) της ένωσης 25 σε DMSO-d_6 (500 MHz, 25 $^\circ\text{C}$).

^{13}C NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ : 160.6 (C-8), 158.5 (C-5), 155.2 (C-1), 154.5 (C-10), 153.1 (C-22), 149.2 (C-11), 137.8 (C-13, C-17), 132.4 (C-21, C-23), 128.9 (C-12), 128.6 (C-14, C-16), 128.3 (C-3), 124.4 (C-19), 115.6 (C-2), 114.0 (C-4), 113.2, 112.8 (C-18), 112.1 (C-20, C-24), 102.4 (C-9), 101.5 (C-15), 96.4 (C-6), 52.4 (C-27), 44.7 (C-30, C-32), 41.2 (C-26), 38.4 (C-28), 28.6 (C-10), 12.3 (C-31, C-33).



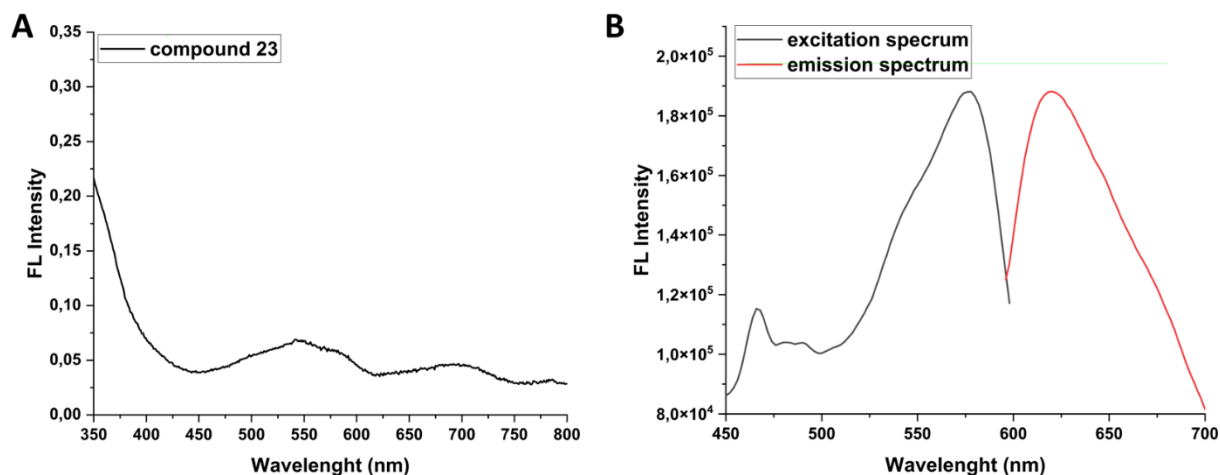
Εικόνα 94: Φάσμα μάζης υψηλής ανάλυσης της ένωσης 25. Το m/z 597.12 αντιστοιχεί στο $[\text{M}^+]$.

Από το φάσμα μάζης αναμέναμε ένα θραύσμα σε m/z 597,1164. Λάβαμε ένα θραύσμα σε m/z 597,12430 που αφορά το $[\text{M}^+]$.

2.3.2 Φασματοσκοπικές ιδιότητες και εκλεκτικότητα της ένωσης 25

Προκειμένου να αξιολογήσουμε τις φασματοσκοπικές ιδιότητες της ένωσης **23**, δηλαδή της νεοσυνθεθείσας χρωστικής πραγματοποιήθηκαν πειράματα τόσο με φασματοσκοπία ορατού

υπεριώδους όσο και φασματοσκοπία φθορισμού. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα της ένωσης (10 μM σε DMSO: PBS, pH 7.40, 1:1 v/v), για να μελετήσουμε τις φασματοσκοπικές της ιδιότητες σε περιβάλλον που να προσομοιάζει εκείνο του πλάσματος του αίματος. Παρατηρούμε ότι εμφανίζει ένα διακριτό φάσμα απορρόφησης με το λ_{max} να εστιάζεται στα 548 nm. Επίσης μελετήθηκαν τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής με λ_{exc} 576 nm και λ_{em} 620 nm. Τέλος υπολογίστηκε η μετατόπιση Stokes ίση με 44 nm.

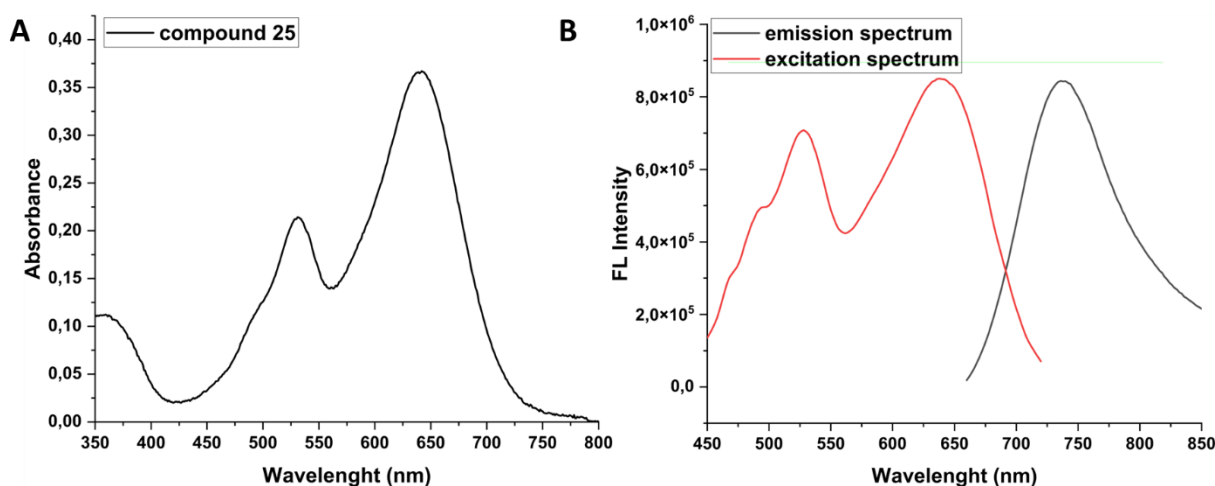


Εικόνα 95: Φάσματα Α) Απορρόφησης και Β) Φθορισμού της ένωσης της ένωσης 23 (10 μM) του δείγματος σε 50% DMSO, 50% PBS buffer (Phosphate-Buffered Saline, 10 mM, pH 7.4) σε θερμοκρασία 25 $^{\circ}\text{C}$ και step 2, ExBw: 10, EmBw: 10.

Πίνακας 5: Μήκη κύματος απορρόφησης, διέγερσης, εκπομπής και μετατόπιση Stokes της ένωσης 23.

λ_{abs} (nm)	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emission}}$ (nm)	Stokes shift (nm)
548	576	620	44

Έχοντας λοιπόν μια πρώτη εικόνα σχετικά τις ιδιότητες του φθοροφόρου πυρήνα προβήκαμε σε αξιολόγηση των φασματικών ιδιοτήτων της ένωσης **25**, τόσο με φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους όσο και φασματοσκοπία φθορισμού. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα της ένωσης (10 μM σε DMSO:PBS, pH 7.40, 1:1 v/v), για να μετρήσουμε τις φασματοσκοπικές της ιδιότητες σε περιβάλλον που να προσομοιάζει εκείνο του πλάσματος του αίματος. Παρατηρούμε ότι εμφανίζει ένα διακριτό φάσμα απορρόφησης με το λ_{max} να εστιάζεται στα 640 nm. Επίσης μελετήθηκαν τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής με λ_{exc} 640 nm και λ_{em} 740 nm. Τέλος υπολογίστηκε η μετατόπιση Stokes ίση με 100 nm.



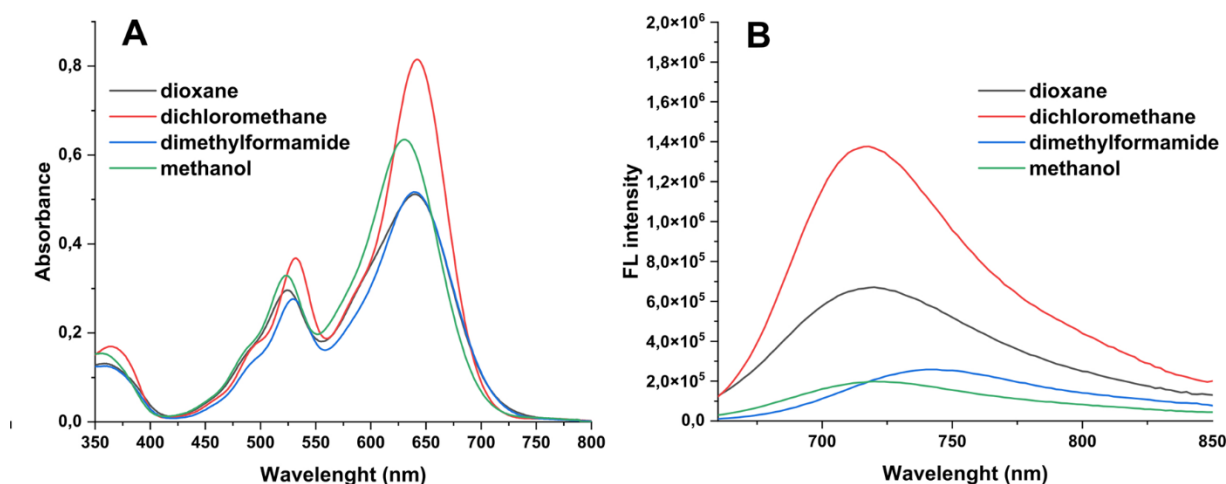
Εικόνα 96: Φάσματα Α) Απορρόφησης και Β) Φθορισμού της ένωσης της ένωσης 25 (10 μM) του δείγματος σε 50% DMSO, 50% PBS buffer (Phosphate-buffered saline, 10 mM, pH 7.4) σε θερμοκρασία 25 °C και step 2, ExBw: 10, EmBw: 10.

Πίνακας 6: Μήκη κύματος απορρόφησης, διέγερσης, τισομπής και Μετατόπιση Stokes της ένωσης 25.

λ_{abs} (nm)	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emission}}$ (nm)	Stokes shift (nm)
640	640	740	100

Δομικά η ένωση παρουσιάζει έναν δέκτη ηλεκτρονικής πυκνότητας (το οξυγόνο που φέρει ένα θετικό φορτίο) και δότες ηλεκτρονιακής πυκνότητας (τις τρι-υποκατεστημένες αμίνες και το ιώδιο). Επίσης η μετατόπιση Stokes είναι 100 nm. Έτσι μπορούμε να προτείνουμε ότι ο μηχανισμός στον οποίο οφείλεται ο φθορισμός της ICT. Ωστόσο για να επιβεβαιωθεί αυτό και να μελετηθούν οι ιδιότητες της ένωσης πραγματοποιήθηκαν επιπλέον πειράματα.

Σε ένα πρώτο βήμα λοιπόν πραγματοποιήθηκαν πειράματα της ένωσης 25 (10 μM) σε διαλύτες με διαφορά στην πολικότητα και την ικανότητα τους να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου (σε μη πολικό διαλύτη, σε πολικό απρωτικό διαλύτη και σε πολικό πρωτικό διαλύτη). Η χρωστική αυτή διαθέτει δομή ώθησης-έλξης η οποία διασφαλίζει ότι μετά την απορρόφηση φωτός το φορτίο μεταφέρεται από την ομάδα δότη στον δέκτη, γεγονός που δημιουργεί μια εξαιρετικά διπολική κατάσταση διεγέρσεως όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Εδώ παρατηρούμε ότι η κορυφή με την υψηλότερη ένταση είναι εκείνη της ένωσης σε CH_2Cl_2 έναν μη πρωτικό πολικό διαλύτη. Δεν παρατηρούμε κάποια χαρακτηριστική μετατόπιση στο κόκκινο όσο αυξάνεται η πολικότητα του διαλύτη. Επομένως συμπεραίνουμε ότι η ένωση δεν λειτουργεί μέσω του φαινομένου TICT



Εικόνα 97: Φάσματα Α) Απορρόφησης και Β) Φθορισμού της ένωσης της ένωσης 25 (10 μM) του δείγματος σε μη πολικό διαλύτη, σε πολικό απρωτικό διαλύτη και σε πολικό πρωτικό διαλύτη. Το σχήμα περιγράφει τα φάσματα του ανιχνευτή παρουσία φαινομένων διαλυτοποίησης κατόπιν διέγερσης στα 640 nm σε θερμοκρασία 25°C, με step 2, ExBw: 5, EmBw: 5.

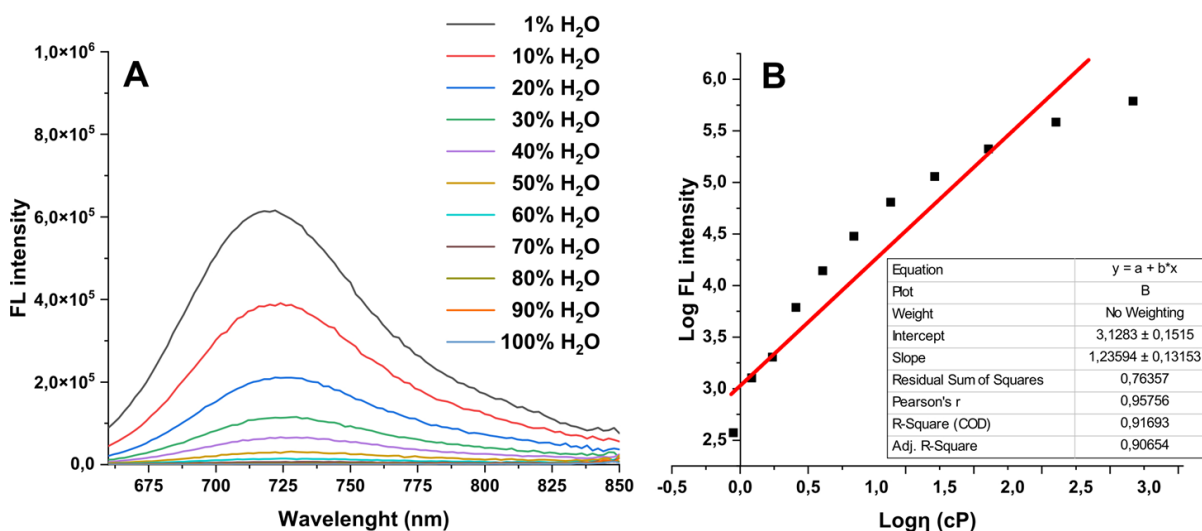
Πίνακας 7: Μήκη κύματος απορρόφησης και εκπομπής της ένωσης 25 συναρτήσει του διαλύτη.

Διαλύτης	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)
Διοξάνιο (dioxane) Μη πολικός διαλύτης	643	718
Διμεθυλφορμαμίδιο (dimethylformamide) Πολικός απρωτικός διαλύτης	643	742
Διχλωρομεθάνιο (dichloromethane)	643	718

Πολικός απρωτικός διαλύτης		
Μεθανόλη (methanol)	628	718
Πολικός πρωτικός διαλύτης		

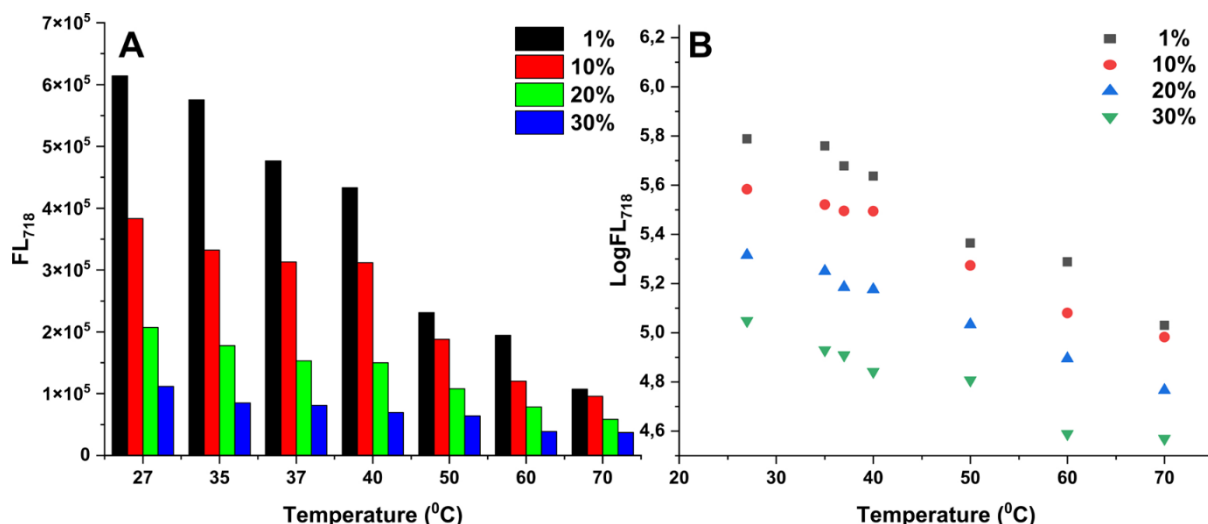
Για να αξιολογήσουμε την ανταπόκριση της ένωσης **25** στη μεταβολή του ιζώδους πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού χρησιμοποιώντας διαφορετικά δυαδικά μίγματα γλυκερόλης/νερού (από 0% έως 99%) αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου (27 °C). Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 98 Α**, η ένωση **25** σε αυτά τα υδατικά μέσα εμφανίζει ένα ασθενές σήμα φθορισμού, ενώ με σταδιακή αύξηση του ποσοστού γλυκερόλης, παρατηρήθηκε ότι το σήμα φθορισμού αυξήθηκε εντυπωσιακά (~ **1416 φορές στα 718 nm**). Αυτή η αύξηση της έντασης του σήματος φθορισμού θα μπορούσε να αποδοθεί στον περιορισμό της περιστροφής όσο αυξάνεται το ιζώδες του περιβάλλοντος. Η ανταπόκριση είναι εξαιρετικά υψηλή και θα μπορούσε να αποτελεί έναν εξαιρετικό διαγνωστικό ρότορα.

Επιπλέον, η ένταση του φθορισμού εμφάνισε εξαιρετική γραμμικότητα ($R^2 = 0.917$) στη μεταβολή του διαλύτη από νερό (logη -0.05 cP) σε γλυκερόλη (99%, logη 2.88 cP). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ένωση **25** είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στη μεταβολή του ιζώδους και θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί σαν ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο ώστε να προσδιορίσει τη μεταβολή του ιζώδους σε ένα καρκινικό μικροπεριβάλλον.



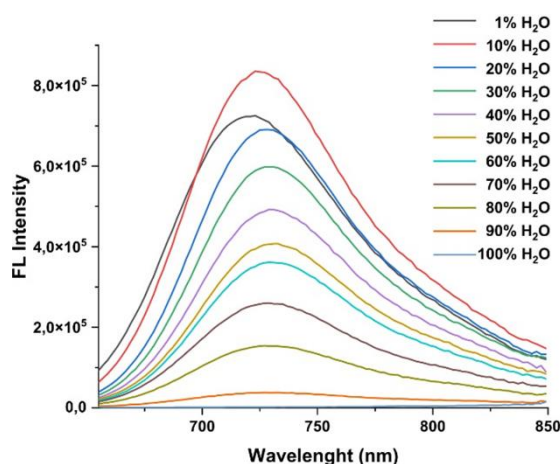
Εικόνα 98: Α) Φάσματα φθορισμού της ένωσης της ένωσης **25** (10 μM) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού (από 0% έως 99% γλυκερόλη) κατόπιν διέγερσης στα 640 nm. Β) Συσχετισμός του λογάριθμου της έντασης φθορισμού στα 718 nm με τον λογάριθμο του ιζώδους (η) στο ίδιο σύστημα γλυκερόλης/νερού, κατόπιν διέγερσης στα 640 nm σε θερμοκρασία 25°C, με step 2, ExBw: 2, EmBw: 2.

Στη συνέχεια, δεδομένου πως το ιζώδες επηρεάζεται σημαντικά από τη μεταβολή της θερμοκρασίας πραγματοποιήθηκαν συμπληρωματικές μελέτες σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 99 Α**, η διαφορά της έντασης του σήματος φθορισμού της ένωσης **25** στα διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού διατηρείται παρά το γεγονός ότι η θερμοκρασία αυξάνεται σημαντικά από 27 °C σε 70 °C. Επιπλέον, όπως απεικονίζεται και στην **Εικόνα 99 Β** η μεταβολή του λογάριθμου της έντασης του φθορισμού μειώνεται σε υψηλές θερμοκρασίες ενώ παράλληλα εμφανίζεται μεγάλη γραμμικότητα ανεξάρτητα του δυαδικού συστήματος γλυκερόλης/νερού. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η αύξηση της έντασης του φθορισμού όσο αυξάνεται το ποσοστό γλυκερόλης δεν οφείλεται σε λόγους διαλυτότητας, αφού αύξηση της διαλυτότητας θα οδηγούσε σε πιο έντονο φθορισμό ενώ παρατηρείται το αντίθετο φαινόμενο.



Εικόνα 99: Α) Συσχέτιση της μεταβολής της έντασης του φθορισμού FL₆₀₂ της ένωσης 25 (10 μ M) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού με τη θερμοκρασία Β) Συσχέτιση του λογαρίθμου έντασης του φθορισμού FL₇₁₈ (10 μ M) της ένωσης 25 και της θερμοκρασίας στα διαφορετικά συστήματα γλυκερόλης/νερού, με step 2, ExBw: 2, EmBw: 2.

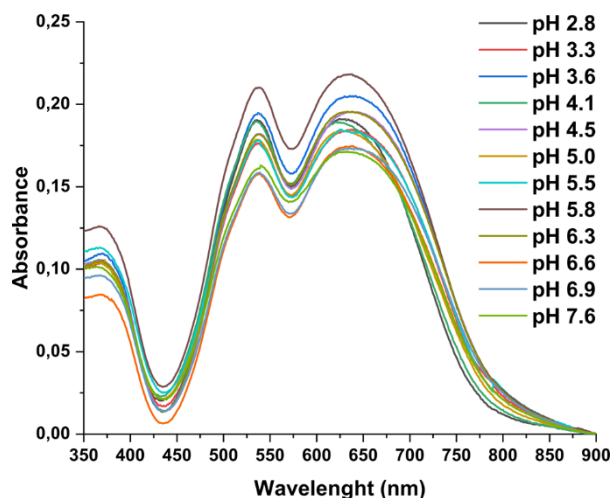
Αργότερα ερευνήσαμε την ικανότητα της ένωσης **25** ανίχνευσης αλλαγών στην πολικότητα. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού σε κάποια ενδεικτικά δυαδικά συστήματα 1,4 διοξάνιου/νερού (από 0% έως 100% 1,4 διοξάνιο), όπου η διηλεκτρική σταθερά (ϵ) ελαττώνεται. Βέβαια η μεταβολή είναι μεγαλύτερη σε ποσοστό 90% H₂O, και μάλιστα παρουσιάζεται αύξηση **~385 φορές** καθιστώντας την ένωση εξαιρετικό ανιχνευτή για μεταβολές της πολικότητας του περιβάλλοντος.



Εικόνα 100: Α Φάσματα φθορισμού της ένωσης της ένωσης 25 (10 μ M) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα διοξάνιου-νερού κατόπιν διέγερσης στα 640 nm σε θερμοκρασία 27 °C και step 2, ExBw: 5, EmBw: 5.

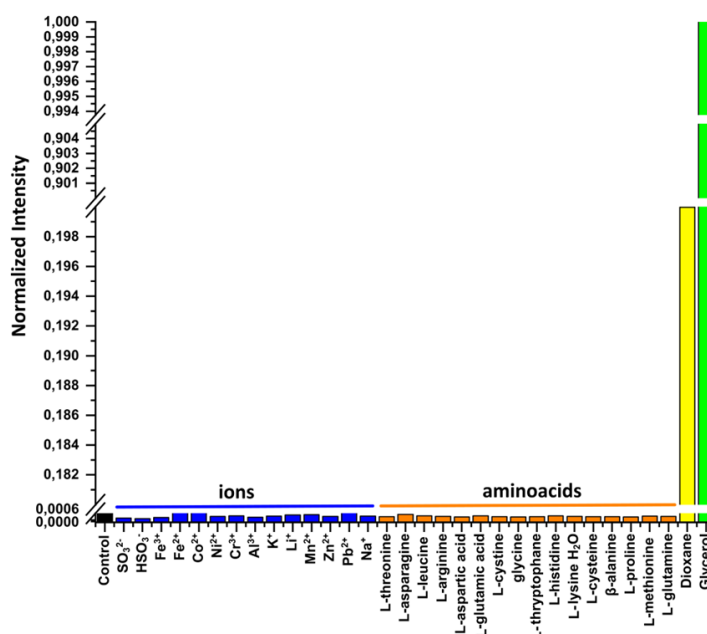
Ακολούθησαν πειράματα σε διαφορετικά pH, για να μελετήσουμε την συμπεριφορά της ένωσης καθώς μεταφέρεται από pH 7.4 που χαρακτηρίζει το πλάσμα του αίματος σε pH 6.0 που χαρακτηρίζει το εξωκυττάριο περιβάλλον των καρκινικών κυττάρων. Προκειμένου να λάβουν χώρα τα πειράματα προετοιμάστηκαν διαλύματα από Citrate Buffer διαφορετικού pH [Stocks solutions: A) 0.1 M solution of citric acid, B) 0.1 M solution of sodium citrate] [123]. Από τα αποτελέσματα παρατηρούμε αύξηση της έντασης φθορισμού όσο μειώνεται το pH. Δηλαδή η ένταση θα παρουσιάζει εντονότερο φθορισμό σε καρκινικό μικροπεριβάλλον. Αυτό πιθανά να οφείλεται στην

πρωτονίωση της διαιθυλάμινο- ομάδας του χρωμοφόρου πυρήνα, που σημαίνει αλλαγή της φύσης του ενός δότη της χρωστικής.



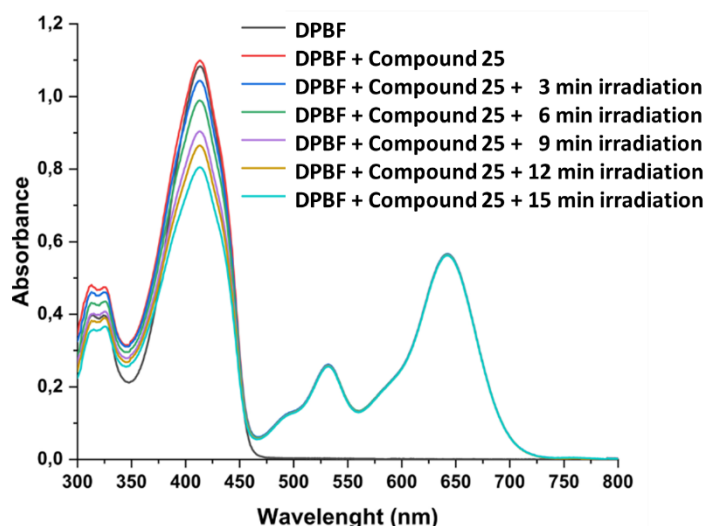
Εικόνα 101: Φάσματα απορρόφησης της ένωσης της ένωσης 25 (10 μM) σε διαφορετικά pH (από 2.8 έως 7.6) σε θερμοκρασία 25°C. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί buffer-citrate.

Έπειτα παρουσιάζονται τα πειράματα εκλεκτικότητας της ένωσης παρουσία διαφορετικών αναλυτών συμπεριλαμβανομένων μετάλλων (K^+ , Na^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{4+} , Al^{3+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Sb^{3+} , Sn^{4+}), αμινοξέων (ιστιδίνη, λευκίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, προλίνη, θρεονίνη, τρυπτοφάνη, κυστεΐνη, γλουταμινικό οξύ, γλουταμίνη, γλυκίνη, γλουταθειόνη, αλανίνη, αργινίνη, ασπαραγίνη, ασπαρτικό οξύ) και ορισμένων υπεροξειδίων του θείου (HSO_3^- , SO_3^{2-}) και φυσικά της γλυκερόλης και του διοξανίου. Η αξιολόγηση έλαβε χώρα με φασματοσκοπία φθορισμού παρακολουθώντας την μεταβολή στα 718 nm. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 102**, ο λόγος αυτός δεν εμφάνισε ιδιαίτερη μεταβολή με την προσθήκη άλλων αναλυτών (100 μM) πέραν της γλυκερόλης (~ 1416 φορές). και λιγότερο του διοξανίου (~ 385 φορές), υποδεικνύοντας υψηλή εκλεκτικότητα της ένωσης σε μεταβολές κυρίως του ιώδους αλλά και της πολικότητας.



Εικόνα 102: Απόκριση του σήματος φθορισμού (I/I_0 στα 718 nm) της ένωσης 25 (10 μ M) έναντι διάφορων αναλυτών (100 μ M), με PBS buffer (Phosphate-buffered saline, 10 mM, pH 7.4) σε θερμοκρασία 25 °C και step 2, ExBw: 2,EmBw: 2.

Τέλος θελήσαμε να εξετάσουμε την εν δυνάμει κυτταροτοξικότητα του μορίου μετά από ακτινοβολήση, μέσω φασματοσκοπίας ορατού υπεριώδους σε διάλυμα της ένωσης σε CH_2Cl_2 . Το πείραμα αυτό είχε κυρίως ποιοτικό σκοπό. Πιο συγκεκριμένα αρχικά λήφθηκε ένα φάσμα του DPBF σε CH_2Cl_2 με συγκέντρωση τέτοια ώστε η απορρόφηση του να είναι ~1 (0.05 mM). Στη συνέχεια στο ίδιο διάλυμα προστέθηκε η ένωση **25** ώστε η απορρόφηση της να είναι ~0.2 και ακολούθησε καταγραφή του φάσματος του μίγματος των δύο ενώσεων. Τέλος το μίγμα αυτό ακτινοβολήθηκε υπό ανάδευση για διάφορα χρονικά διάστημα, ενώ ενδιάμεσα καταγράφονταν τα φάσματα απορρόφησης. Παρατηρούμε ότι για το χρονικό διάστημα από 0 έως 15 λεπτά ακτινοβολήσης η ένταση της κορυφής του DPBF μειώνεται ραγδαία γεγονός που σημαίνει ότι παράγονται δραστικές ρίζες μονήρους οξυγόνου. Από την άλλη η ένταση της ένωσης δεν επηρεάζεται από την ακτινοβολήση επομένως θα λέγαμε ότι είναι φωτοσταθερή.



Εικόνα 103: Απόκριση του σήματος απορρόφησης της ένωσης 25 (10 μ M) και του μίγματος της ένωσης 25 και του DPBF έναντι διαφορετικών χρόνων ακτινοβολήσης.

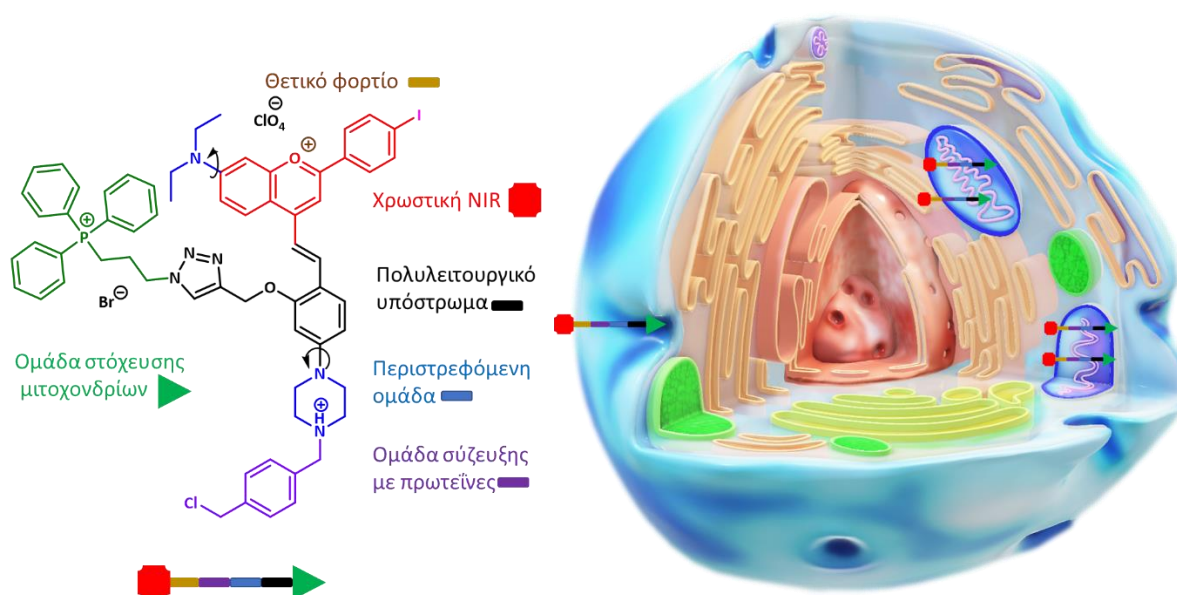
Συμπερασματικά λοιπόν συνθέσαμε μια NIR χρωστική με εξαιρετικές φωτοτοφυσικές ιδιότητες και εξαιρετική εκλεκτικότητα αφού η ένταση του φθορισμού της μεταβάλλεται μόνο στις φυσικοχημικές παραμέτρους κυρίως του ιξώδους και λιγότερο -αλλά εξίσου σημαντικό- της πολικότητας. Αναμένουμε να φθορίζει περισσότερο στο περιβάλλον του όγκου όχι μόνο γιατί αυξάνεται το ιξώδες και μειώνεται η πολικότητα αλλά και γιατί μειώνεται το pH. Επίσης αναμένουμε εξαιρετική ιστική διείσδυση και δυνατότητα κυτταροτοξικότητας. Αφού απορροφά φως εντός της περιορισμένης περιοχής της NIR ακτινοβολίας με ενέργεια ικανή να δημιουργεί ρίζες οξυγόνου στην απλή κατάσταση.

2.3.3 Συνθετική πορεία της διαγνωστικής ένωσης 32

Για την σύνθεση της θεραπευτογνωστικής ένωσης **32** χρησιμοποιήθηκε το πολυλειτουργικό υπόστρωμα **6**, και εκμεταλλευόμενοι: i) την αλδεΐδη που επιτρέπει την ενσωμάτωση του νεοσυνθετιμένου παράγοντα απεικόνισης - φωτοευαίσθητοποιητή, μέσω συμπύκνωσης τύπου Knoevenagel ii) την τελική ομάδα αλκινίου, για τη σύζευξη με έναν παράγοντα στόχευσης μιτοχονδρίων και iii) τον πιπεραζινικό δακτύλιο για την ενσωμάτωση με έναν παράγοντα σύζευξης με βιοδραστικά μόρια. Έτσι συνθέσαμε έναν ανιχνευτή που μπορεί να χαρτογραφήσει τις μεταβολές του ιξώδους των μιτοχονδρίων, με δυνατότητα κυτταροτοξικότητας σε περίπτωσης ανίχνευσης

παθήσεων, ώστε να συγκριθεί με την θεραπευτική ένωση **25**, που έχει παρόμοια χαρακτηριστικά. Στην περίπτωση της ένωσης **32** έχουμε μια διαφορετική περιστρεφόμενη ομάδα και ένα στοιχείο στόχευσης των μιτοχονδρίων γνωστό από την βιβλιογραφία.

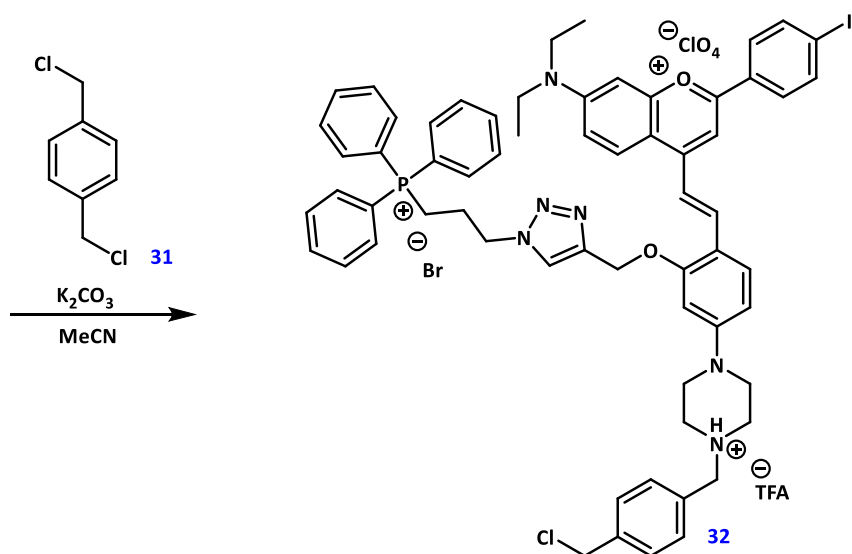
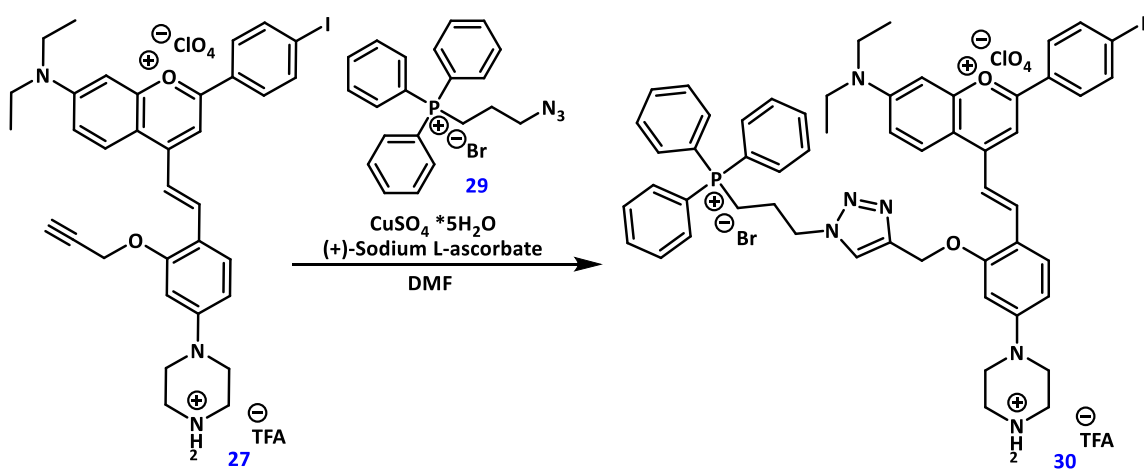
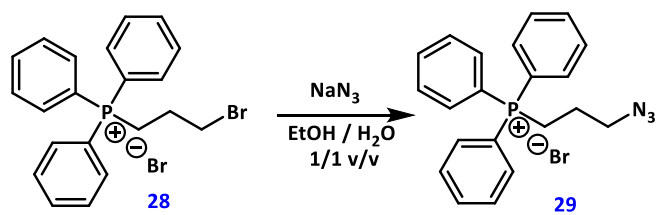
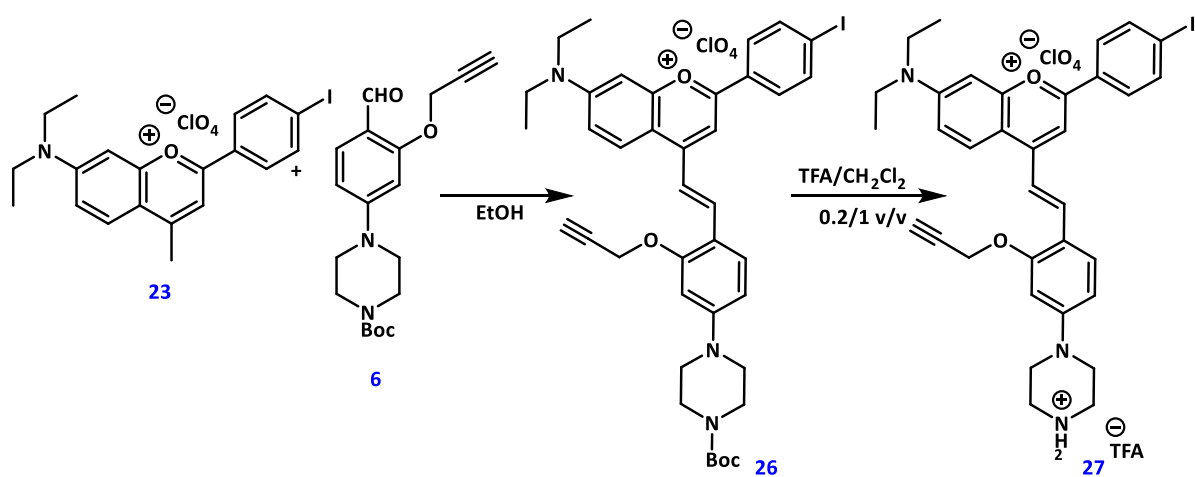
Πιο συγκεκριμένα, προκειμένου να συντεθεί η θεραπευτική ένωση που στοχεύουν τα μιτοχόνδρια, αρχικά πραγματοποιήθηκε κατάλληλη τροποποίηση στο εμπορικά διαθέσιμο ανάλογο τριφαινυλοφωσφίνης, μόριο γνωστό από τη διεθνή βιβλιογραφία για τη χρήση του ως παράγοντας εκλεκτικής στόχευσης των μιτοχονδρίων, ώστε να διαθέτει ομάδα αζιδίου (ένωση **29**) [124, 125]. Στη συνέχεια, το ανάλογο αυτό συνδυάστηκε μέσω καταλυόμενης από χαλκό 1,3 κυκλοπροσθήκης μεταξύ του αζιδίου που φέρει και του τελικού αλκινίου της ένωσης **27** προκειμένου να συντεθεί η πρόδρομη ένωση **30**. Τέλος, έλαβε χώρα, μια αντίδραση S_N2 υποκατάστασης μεταξύ της δευτεροταγούς αμινομάδας του πιπεραζινικού δακτυλίου της ένωσης **30**, και του ενός χλωρίου του διχλωρο p-ξυλυλενίου προς σχηματισμό της ένωσης **32**.



Εικόνα 104: Σχηματική αναπαράσταση των δομικών συστατικών και του προτεινόμενου τρόπου δράσης της διαγνωστικής ένωσης **32**.

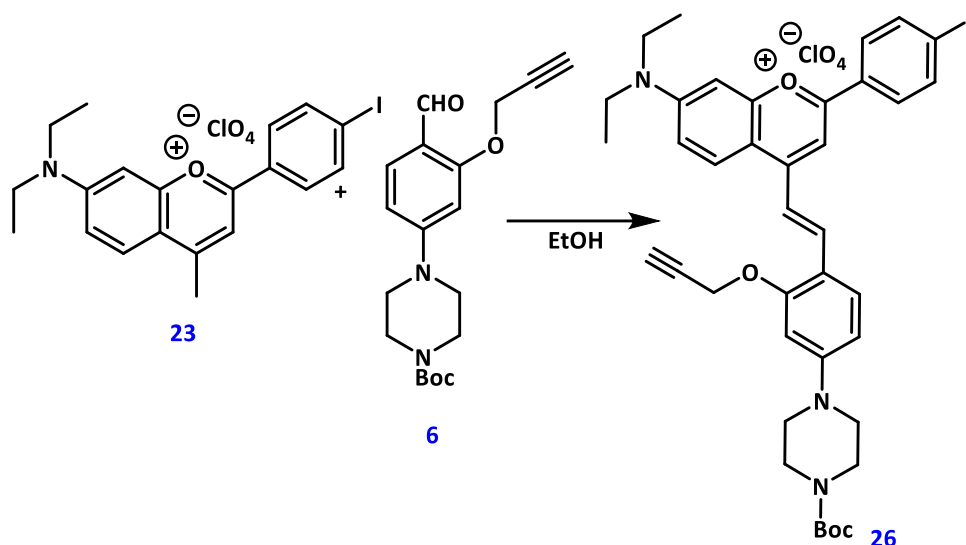
Επομένως, διατηρώντας σαν σημείο αναφοράς την ανταπόκριση σε μεταβολές του ιζώδους και την στόχευση των μιτοχονδρίων χρησιμοποιήσαμε την νεοσυντεθείμενη χρωστική και στη συνέχεια μετά από μια αντίδραση τύπου Knoevenagel συνδέθηκε με ένα μόριο που έχει δυνατότητα περιστροφής και συνεπώς και ανταπόκρισης σε μεταβολές του ιζώδους και ένα τμήμα όπου μπορεί να συζεύγνυται με πρωτεΐνες. Πιο συγκεκριμένα η χρωστική διαθέτει:

1. φθοροφόρο σκελετό τύπου άλατος φλαβυλίου, που εκπέμπει στην περιοχή του εγγύς υπερύθρου και διαθέτει ιδιότητες φωτοευαισθητοποιητή,
2. ομάδα ανταπόκρισης σε μεταβολές του ιζώδους,
3. ομάδα στόχευσης με ένα θετικό φορτίο που θα το οδηγεί στα μιτοχόνδρια λόγω του αρνητικού δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης,
4. και τέλος ομάδα που συζεύγνυται με πρωτεΐνες/ένζυμα.



Εικόνα 105: Πειραματική πορεία σύνθεσης της θεραπευτικής ένωσης 32

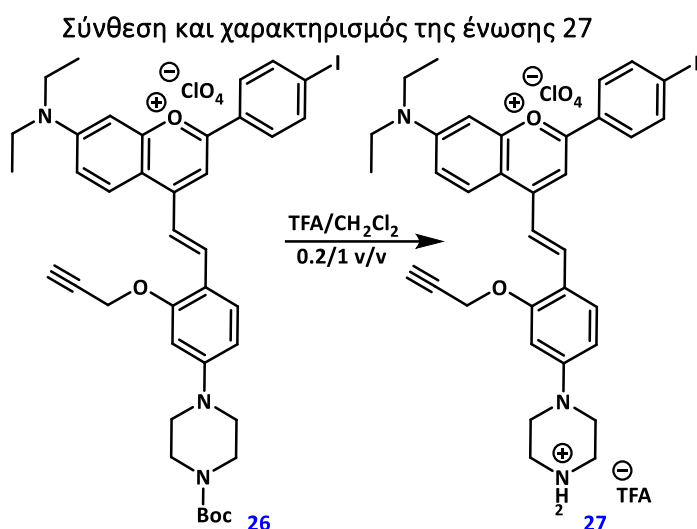
Σύνθεση της ένωσης 26



Εικόνα 106: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 26.

Σε διάλυμα της ένωσης 6 (75 mg, 0,14 mmol) προστέθηκε η ένωση 23 (50 mg, 0.14 mmol), σε αιθανόλη (4 mL) και το μίγμα της αντίδρασης θερμάνθηκε με αναρροή για 15 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με TLC χρωματογραφία με σύστημα διαλυτών MeOH/CH₂Cl₂ (5% v/v). Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό υψηλό κενό και το μίγμα της αντίδρασης υποβλήθηκε σε καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης (2% MeOH/CH₂Cl₂) ώστε να λάβουμε το επιθυμητό προϊόν σαν μπλε στερεό (114 mg, 93%).

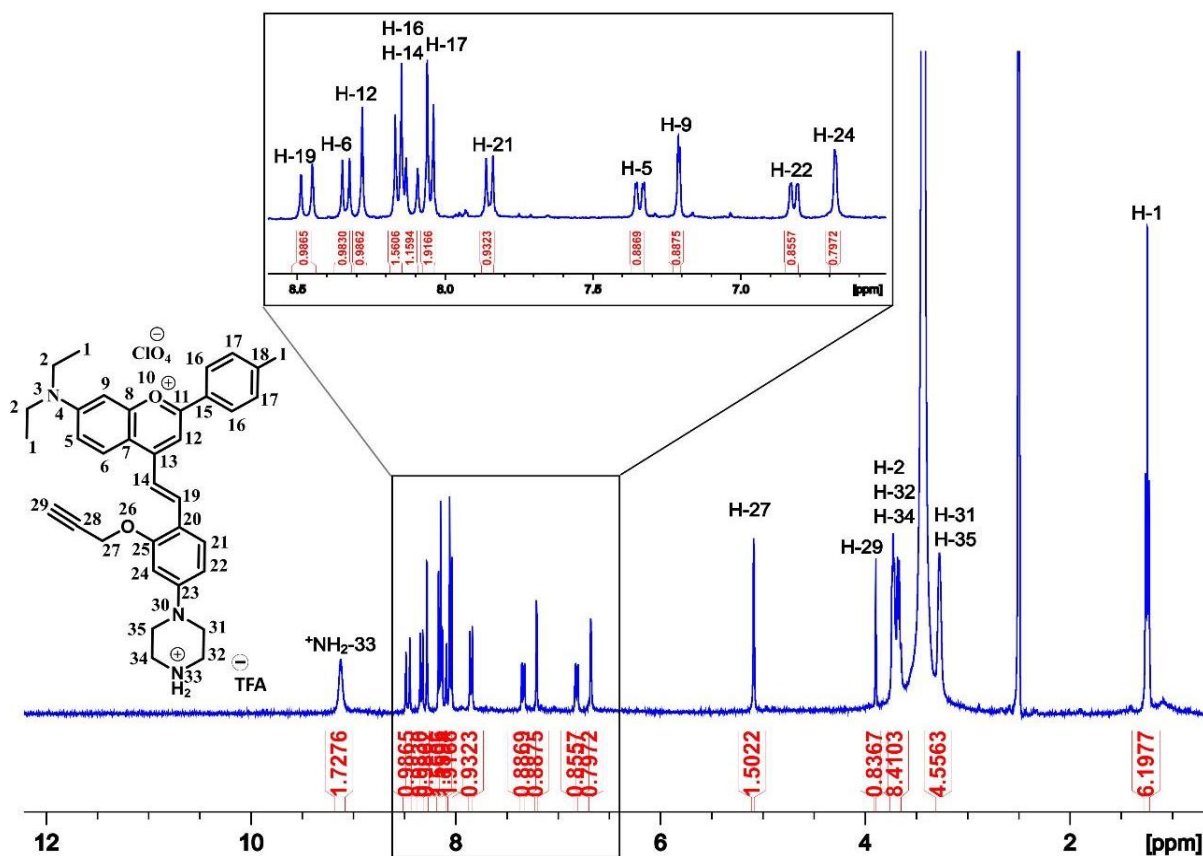
Το βήμα αυτό της συνθετικής πορείας είναι η αντίδραση συμπύκνωσης τύπου Knoevenagel, της ένωσης 6 με την ένωση 23 προκειμένου να σχηματιστεί η α, β ακόρεστη ένωση 26, απουσία όμως βάσης, αφού τα πρωτόνια είναι πλέον όξινα. Η χρωστική 26 φέρει δυο διαφορετικές λειτουργικές ομάδες, επιτρέποντας μεταγενέστερη τροποποίηση στο σκελετό της ένωσης, ένα τελικό αλκίνιο και έναν πιπεραζινικό δακτύλιο. Το τελικό αλκίνιο επιτρέπει τη σύζευξη μέσω αντίδρασης κυκλοπροσθήκης με διάφορα ογκοστοχευτικά μόρια που φέρουν ομάδα αζίδου κατευθύνοντας το μόριο μας στο επιθυμητό περιβάλλον. Θα πρέπει να τονιστεί ότι κρίθηκε απαραίτητο σε αυτό το στάδιο της συνθετικής πορείας η διατήρηση της προστατευτικής ομάδας Boc στο άζωτο της δευτεροταγούς αμινομάδας λόγω του πιθανού σχηματισμού βάσης Schiff με την καρβονυλομάδα της ένωσης 6, ακριβώς όπως και στην περίπτωση της διαγνωστικής ένωσης 17 που αναφέρθηκε προηγουμένως.



Εικόνα 107: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 27.

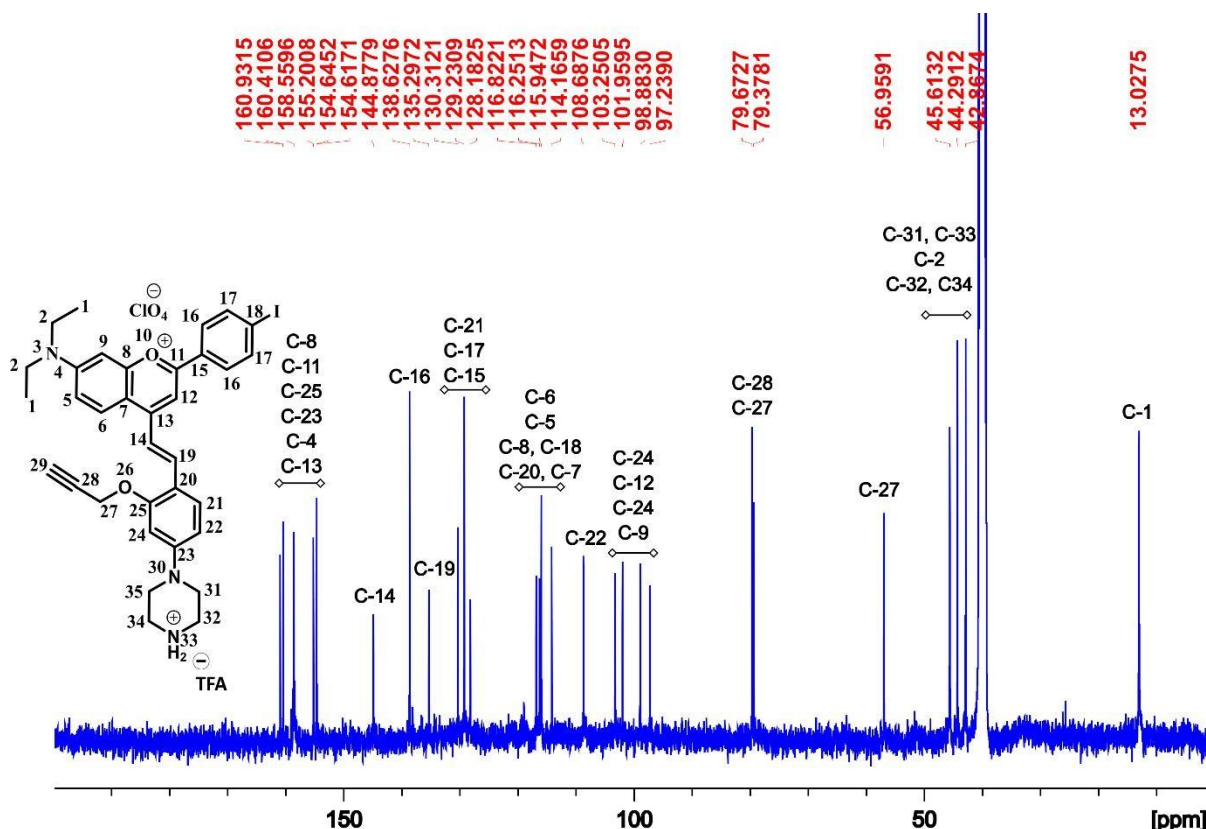
Σε παγωμένο διάλυμα της ένωσης **26** (114 mg, 0.13 mmol) σε CH_2Cl_2 (8 mL), προστέθηκε σταγονομετρικά τριφθοροοξικό οξύ (2 mL) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με TLC χρωματογραφία με σύστημα διαλυτών $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (10% v/v). Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό υψηλό κενό. Το μίγμα της αντίδρασης υποβλήθηκε σε καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης (10% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) ώστε να λάβουμε το επιθυμητό προϊόν σαν μπλε στερεό (105 mg, 95%).

Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **27** μέσω φασματοσκοπίας NMR.



Εικόνα 108: Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 27 σε $\text{DMSO}-d_6$ (400 MHz, 25 °C).

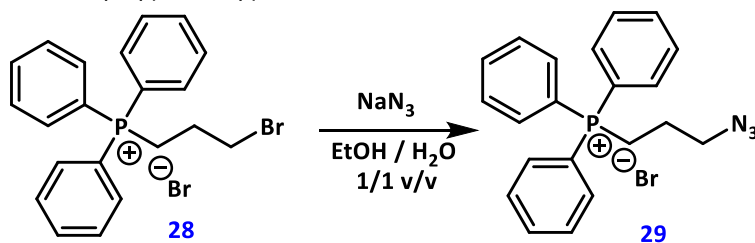
^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 9.19-9.07 (br, 2H, $^+\text{NH}_2$ -33), 8.51-8.43 (d, $J=16$ Hz, 1H, H19), 8.37-8.31 (d, $J=9.77$ Hz, 1H, H-6), 8.31-8.27 (s, 1H, H-12), 8.19-8.15 (d, $J=8.80$ Hz, 2H, H-16), 8.15-8.09 (d, $J=16$ Hz, 1H, H-14), 8.08-8.04 (d, $J=8.80$ Hz, 2H, H-17), 7.88-7.84 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, H-21), 7.37-7.33 (dd, $J=7.4$ Hz, $J=2.43$ Hz, 1H, H-5), 7.23-7.20 (d, $J=2.43$ Hz, 1H, H-9), 6.85-6.81 (dd, $J=7.21$ Hz, $J=1.73$ Hz, 1H, H-22), 6.70-6.67 (d, $J=1.73$ Hz, 1H, H-24), 5.11-5.08 (d, $J=2.03$ Hz, 1H, H-27), 3.22-3.89 (t, $J=2.25$ Hz, 1H, H-29), 3.77-3.64 (m, 8H, H-2, H-32, H-34), 3.32-3.25 (m, 4H, H-31, H-35), 1.28-1.22 (t, $J=6.7$ Hz, 6H, H-1).



Εικόνα 109: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 27 σε DMSO-d_6 (100 MHz, 25 °C).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 160,9 (C-8), 160.4 (C-11), 158.6 (C-25), 155.2 (C-23), 154.64 (C-4), 154.62 (C-13), 144.89 (C-14), 138.6 (C-16), 135.3 (C-19), 130.33 (C-21), 129.24 (C-17), 128.19 (C-15), 116.8 (C-6), 116.26 (C-5), 115.96 (C-8, C-18), 114.16 (C-7, C-20), 108.69 (C-22), 103.26 (C-24), 101.9 (C-12), 98.9 (C-24), 97.25 (C-9), 79.69 (C-28), 79.39 (C-29), 56.97 (C-27), 45.62 (C-31, C-35), 44.3 (C-2), 42.88 (C-32, C-34), 13.04 (C-1).

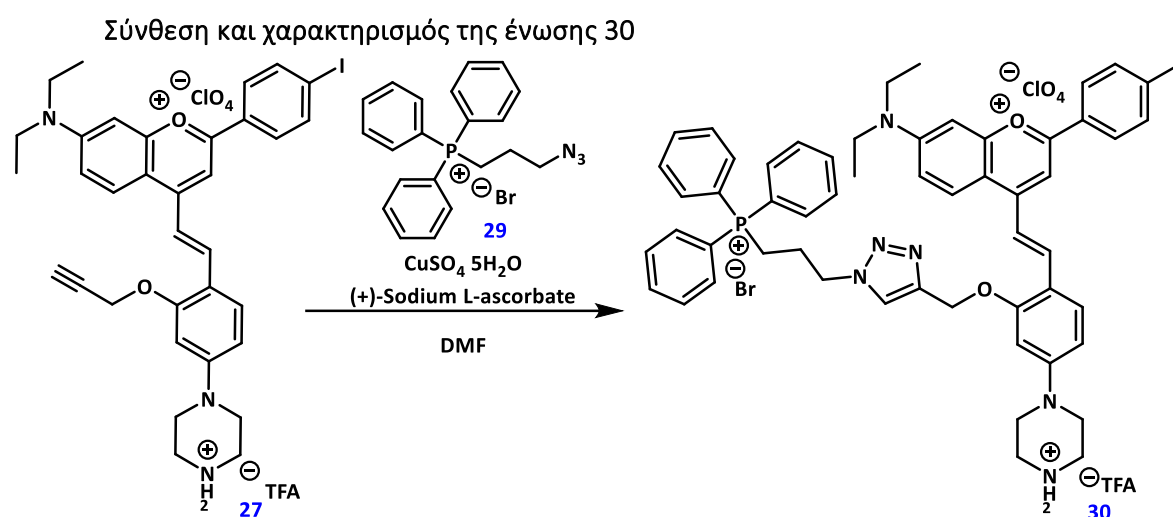
Σύνθεση της ένωσης 29



Εικόνα 110: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 29.

Σε ένα διάλυμα υδροβρωμικού άλατος (3-βρωμοπροπυλο) τριφαινυλοφωσφίνης (50 mg, 0.1077 mmol) σε μίγμα αιθανόλης νερού (1:1, 2 mL / 2 mL), προστέθηκε το νατραζίδιο (14 mg, 0.215 mmol) και το διάλυμα της αντίδρασης θερμάνθηκε με αναρροή για 12 ώρες. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε η αιθανόλη υπό υψηλό κενό και το υπόλειμμα διηθήθηκε και εκπλύθηκε με άφθονο νερό ώστε να παραλάβουμε το επιθυμητό προϊόν σαν λευκό στερεό (42.7 mg, 93%).

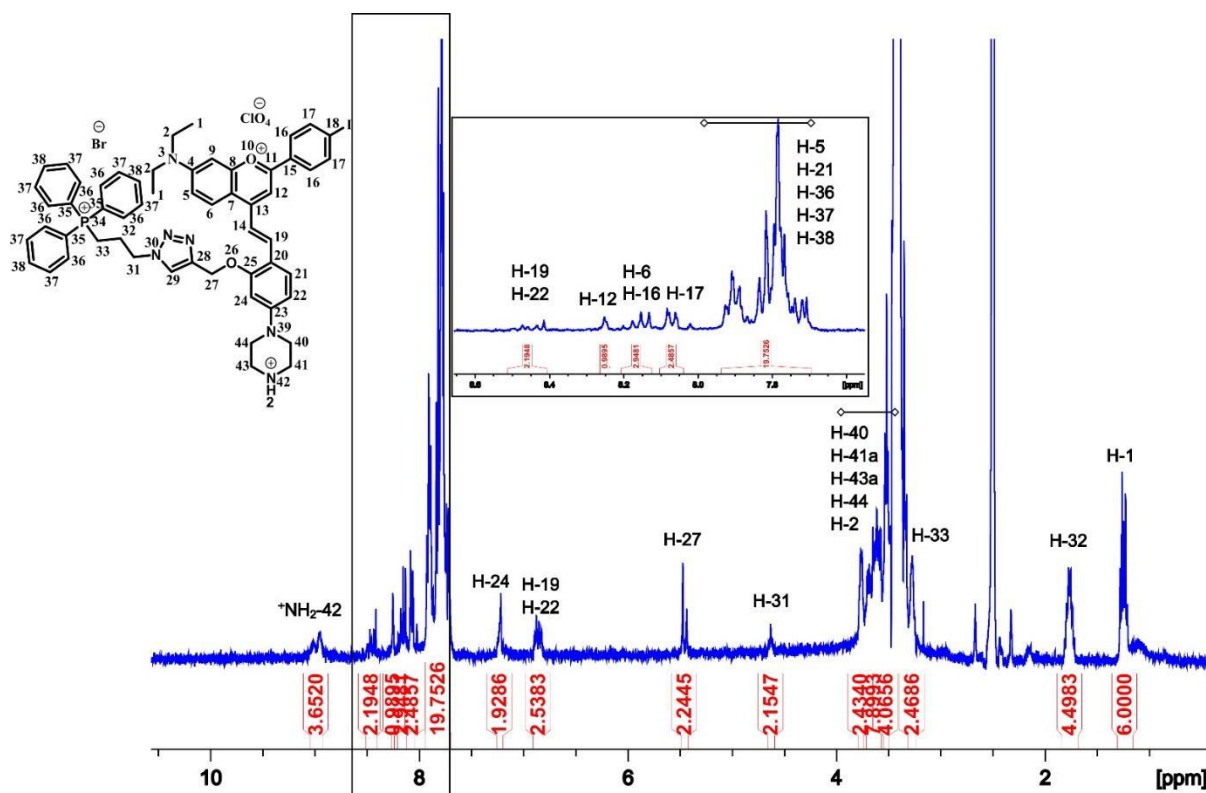
Ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **29** μέσω φασματοσκοπίας NMR παρατίθεται στο παράρτημα του κειμένου.



Προκειμένου να διασφαλίσουμε ότι η διαγνωστική ένωση θα συσσωρεύεται εκλεκτικά στα μιτοχόνδρια των καρκινικών κυττάρων, πραγματοποιήθηκε αντίδραση 1,3 κυκλοπροσθήκης μεταξύ του αναλόγου που φέρει τελικό αλκίνιο και του αναλόγου που φέρει τελικό αζίδιο. Η αντίδραση αυτή καταλύεται με την παρουσία χαλκού ώστε να επιτύχουμε τοποειδικό σχηματισμό του ετεροκυκλικού 1,4-διυποκατεστημένου 1,2,3-τριαζολίου σύμφωνα με τον μηχανισμό όπως περιγράφεται παραπάνω.

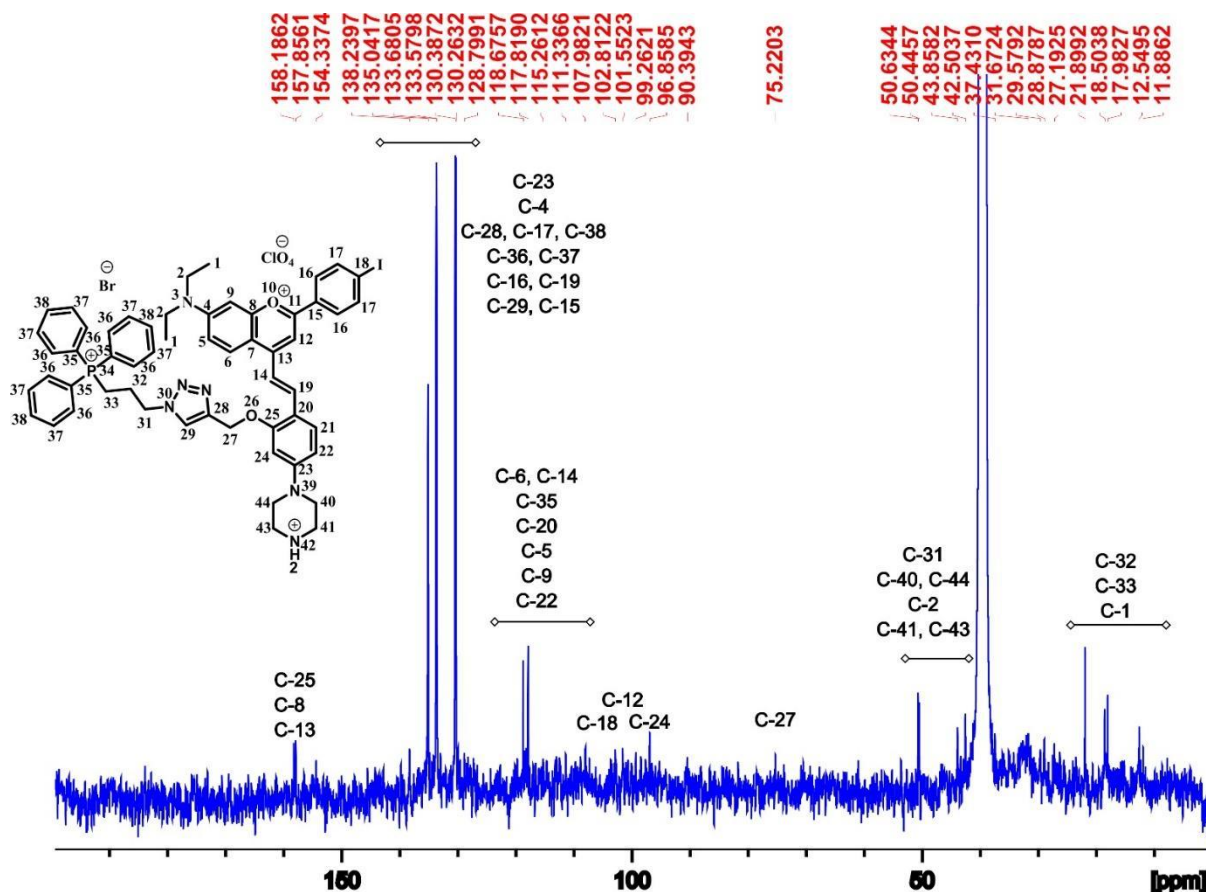
Σε ένα διάλυμα της ένωσης **27** (185 mg, 0.25 mmol) σε DMF (2 mL DMF), προστέθηκε καταλυτική ποσότητα δισθενούς χαλκού ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 4,6 mg, 0.019 mmol) και καταλυτική ποσότητα ασκορβικού νατρίου (AsCONa , 5.95 mg, 0.05 mmol) αργότερα ακολούθησε η προσθήκη της ένωσης **29** (319 mg, 0.75 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 36 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με TLC χρωματογραφία με σύστημα διαλυτών $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (10% v/v). Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό υψηλό κενό. Το ακατέργαστο προϊόν καθαρίστηκε με υγρή χρωματογραφία HPLC (από 70:30 H_2O : ACN έως 0:100 H_2O : ACN, με απεικόνιση στα 254 nm) για να δώσει ένα μπλε στερεό (87 mg, 30%).

Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **30** μέσω φασματοσκοπίας NMR.



Εικόνα 112: Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 30 σε DMSO-d_6 (400 MHz, 25 °C).

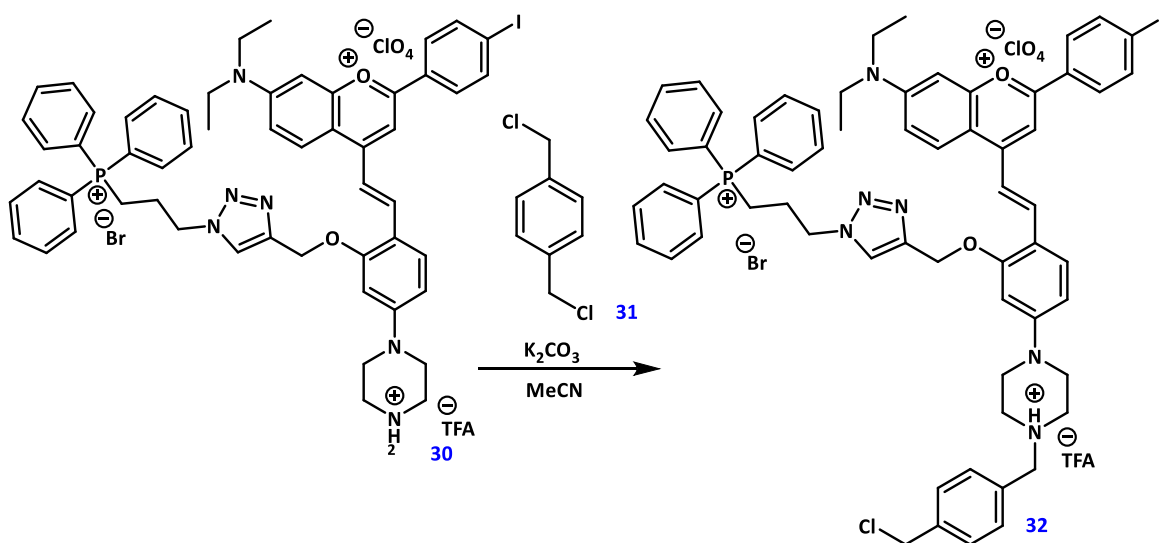
^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 9.05-8.93 (m, 2H, $^+\text{NH}_2$ -42), 8.51-8.41 (m, 1H, H-14, H-29), 8.27-8.24 (s, 1H, H-12), 8.20-8.12 (m, 7H, H-6, H-16), 8.10-8.04 (m, 2H, H-17), 7.95-7.69 (m, 19H, H-5, H-9, H-21, H-36, H-37, H-38), 7.24-7.21 (m, 1H, H-24), 6.91-6.81 (m, 2H, H-19, H-22), 5.49-5.42 (m, 2H, H-27), 4.65-4.60 (t, $J=7.4$ Hz, 2H, H-31), 3.79-3.57 (m, 8H, H-40, H-41, H-43, H-44), 3.55-3.49 (m, 4H, H-2), 3.31-3.24 (m, 2H, H-33), 1.82-1.71 (m, 2H, H-32), 1.31-1.16 (m, 6H, H-1).



Εικόνα 113: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 30 σε DMSO- d_6 (100 MHz, 25 °C).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 158.18 (C-25), 157.86 (C-8), 154.33 (C-13), 138.24 (C-23), 135.04 (C-4), 133.68 (C-28, C-17, C-38), 133.57 (C-36, C-37), 130.39 (C-16, C-19), 128.80 (C-15, C-29), 118.67 (C-6, C-14), 117.82 (C-35), 115.26 (C-20), 115.26 (C-5), 111.34 (C-9), 107.98 (C-22), 99.26 (C-18), 96.86 (C-12), 90.39 (C-24), 75.22 (C-27), 50.63 (C-31), 43.86 (C-40, C-44), 42.50 (C-2), 37.43 (C-41, C-43), 21.90 (C-32), 18.50 (C-33), 12.55 (C-1).

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 32

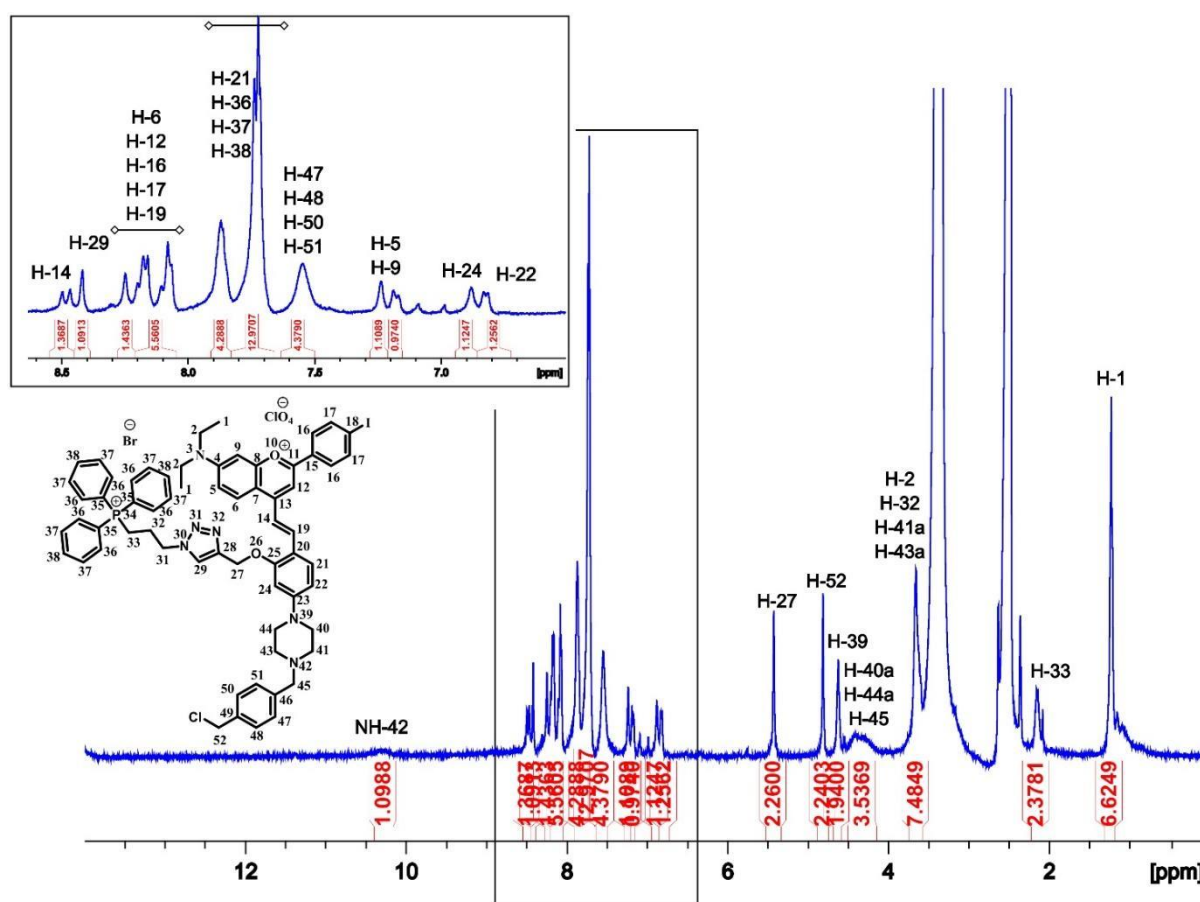


Εικόνα 114: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 32.

Για την ολοκλήρωση της σύνθεσης της διαγνωστικής ένωσης **32**, απαιτείται μια αντίδραση S_N2 υποκατάστασης μεταξύ της δευτεροταγούς αμινομάδας του πιπεραζινικού δακτυλίου της ένωσης **15**, και του ενός χλωρίου του διχλωρο p-ξυλυλενίου. Για να αποφύγουμε την διπλή υποκατάσταση και στα δυο χλώρια χρησιμοποιήσαμε μεγάλη περίσσεια του διχλωρο p-ξυλυλενίου (10 eq).

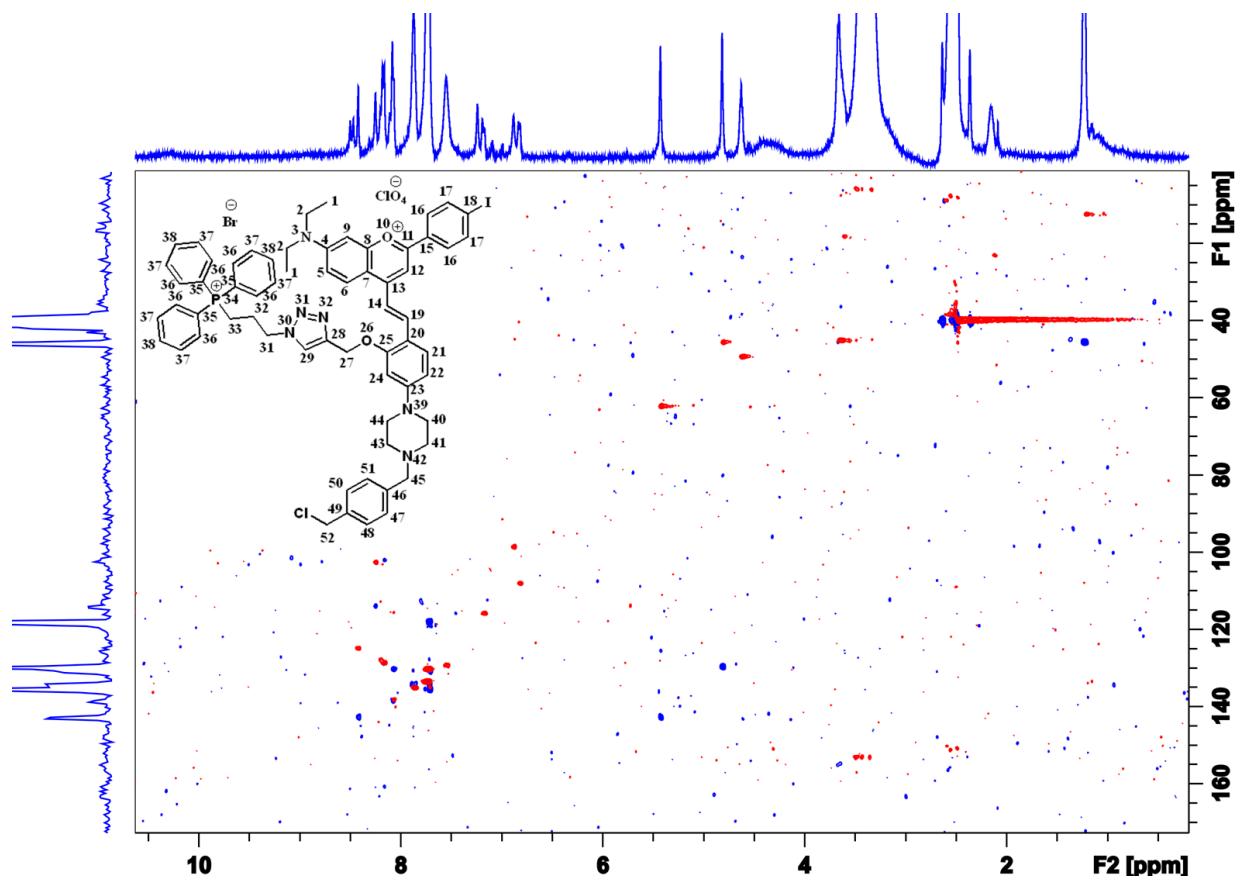
Σε ένα διάλυμα της ένωσης **30** (16.4 mg, 0.013 mmol) σε άνυδρο MeCN (2 mL), προστέθηκε ποσότητα άλατος καλίου ανθρακικών ιόντων K_2CO_3 (3.5 mg, 0.025 mmol) και αργότερα ακολούθησε η προσθήκη του διχλωρο p-ξυλυλενίου (22.6 mg, 0.13 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε, θερμάνθηκε με αναρροή για 15 ώρες και παρακολουθήθηκε με TLC χρωματογραφία με σύστημα διαλυτών MeOH/ CH_2Cl_2 (10% v/v). Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό υψηλό κενό. Το ακατέργαστο προϊόν καθαρίστηκε με υγρή χρωματογραφία HPLC (από 75:25 H_2O : ACN έως 15:85 H_2O : ACN, με απεικόνιση στα 254 nm) για να δώσει ένα μπλέ στερεό (1 mg, 6.5%).

Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **32** μέσω φασματοσκοπίας NMR και φασματομετρία μάζας.



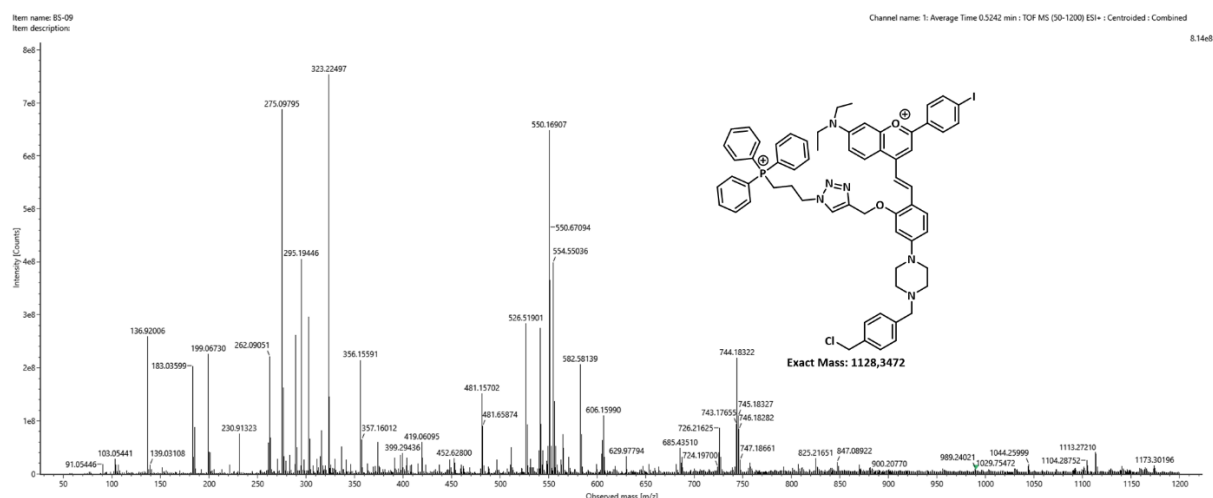
Εικόνα 115: Φάσμα 1H -NMR της ένωσης **32** σε $DMSO-d_6$ (500 MHz, 25 °C).

1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 10.40-10.16 (br, 1H, NH-42), 8.53-8.45 (d, $J=16$ Hz, 1H, H-14), 8.45-8.39 (s, 7 Hz, 1H, H-29), 8.28-8.04 (m, 7H, H-6, H-12, H-16, H-17, H-19), 7.90-7.66 (m, 18H, H-21, H-36, H-37, H-38), 7.63-7.48 (br, 4H, H-47, H-48, H-50, H-51), 7.28-7.15 (m, 2H, H-5, H-9), 6.94-6.85 (s, 1H, H-24), 6.85-6.79 (d, $J=8.08$ Hz, 1H, H-22), 5.52-5.38 (s, 2H, H-27), 4.82-4.75 (s, 2H, H-52), 4.62-4.57 (t, $J=6.3$ Hz, 2H, H-39), 4.49-4.14 (m, 4H, H-40a, H-44a, H-45), 3.75-3.58 (m, 8H, H-2, H-32, H-41a, H-43a), 2.22-2.10 (m, 2H, H-33), 1.31-1.18 (t, $J=6.7$ Hz, 6H, H-1).



Εικόνα 116: Υπέρθωση φασμάτων 2D ^1H - ^{13}C HSQC (κόκκινο)-HMBC (μπλε) της ένωσης 32 σε DMSO-d_6 (500 MHz, 25 °C).

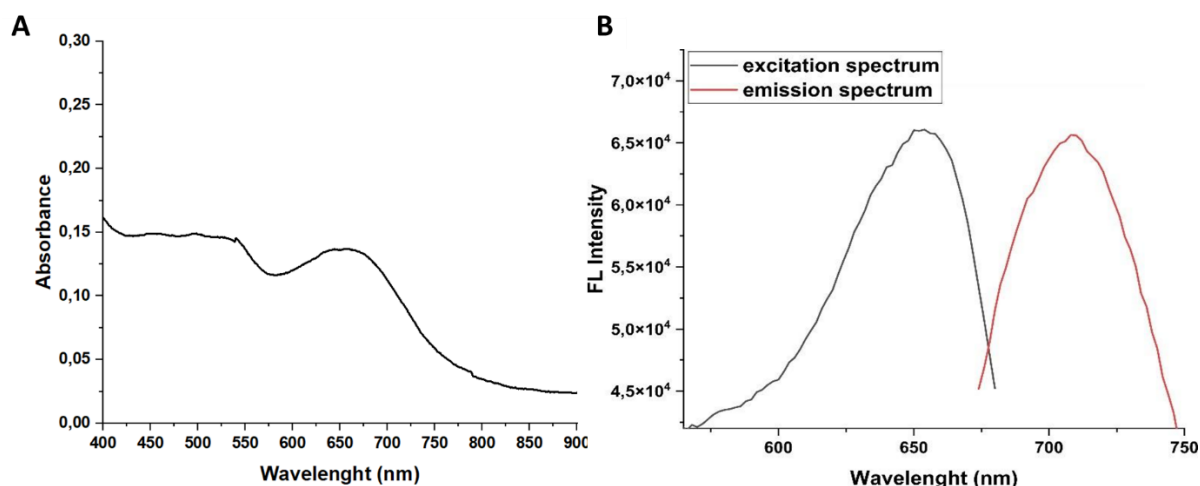
^{13}C NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ : 160.9 (C-25), 142.83 (C-28), 138.77 (C-16), 135.64 (C-38), 134.08 (C-37), 130.56 (C-21, C-36), 130.4 (C-15), 129.9 (C-46, C-47, C-48, C-50, C-51), 129.3 (C-49), 129.19 (C-17, C-19), 128.2 (C-6), 125.47 (C-29), 118.16 (C-20), 116.38 (C-5), 114 (C-13), 108.75 (C-22), 103.37 (C-12), 102.11 (C-18), 99.26 (C-24), 97.7 (C-9), 62.9 (C-27), 50.2 (C-31), 46.3 (C-52), 45.3 (C-2, C-40, C44), 23.7 (C-33), 18.7 (C-32), 12.9 (C-1).



Εικόνα 117: Φάσμα μάζης υψηλής ανάλυσης της ένωσης 32. Το m/z 1129.38 αντιστοιχεί στο $[\text{M}^+]$. Από το φάσμα μάζης αναμέναμε ένα θραύσμα σε m/z 1128,3472. Λάβαμε ένα θραύσμα σε m/z 550,16907 που πιθανά αφορά το $[\text{M}^+ \text{CH}_2\text{CH}_3]$.

2.2.4 Φασματοσκοπικές ιδιότητες και εκλεκτικότητα της ένωσης 32

Προκειμένου να αξιολογήσουμε τις φασματοσκοπικές ιδιότητες της ένωσης **32**, πραγματοποιήθηκαν πειράματα τόσο με φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους όσο και φασματοσκοπία φθορισμού. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα της ένωσης (10 μM σε DMSO: PBS, pH 7.40, 1:1 v/v), για να μελετήσουμε τις φασματοσκοπικές της ιδιότητες σε περιβάλλον που να προσομοιάζει εκείνο του πλάσματος του αίματος. Μελετήθηκαν τα φάσματα απορρόφησης με λ_{abs} 660 nm, και τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής με λ_{exc} 654 nm και λ_{em} 710 nm αντίστοιχα. Υπολογίστηκε η μετατόπιση Stokes ίση με 56 nm.



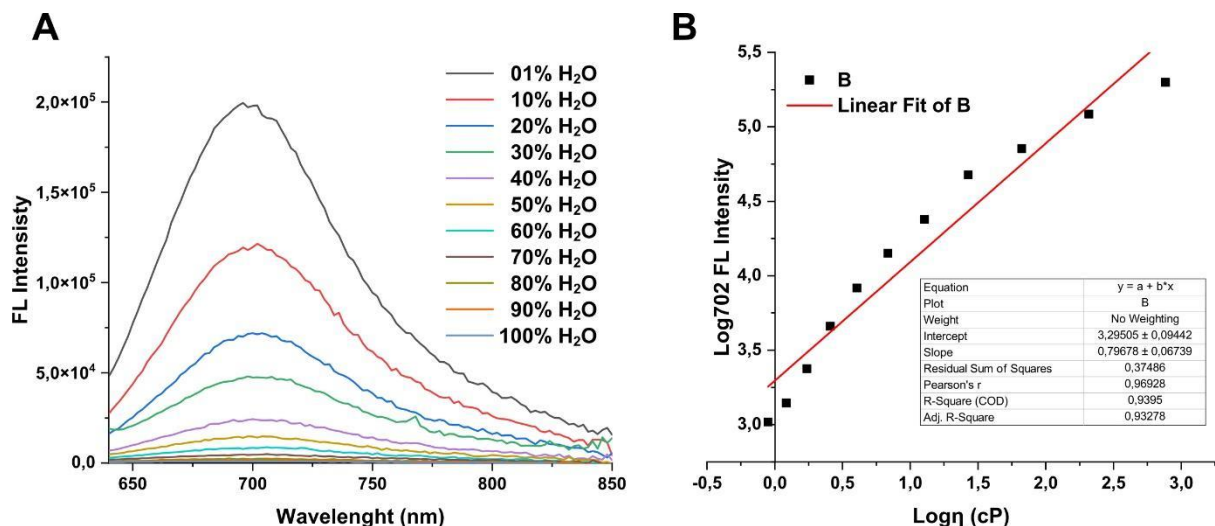
Εικόνα 118: Φάσματα Α) Απορρόφησης, Β) φθορισμού της ένωσης της ένωσης **32** (10 μM) του δείγματος σε 50% DMSO, 50% PBS buffer (Phosphate-buffered saline, 10 mM, pH 7.4) σε θερμοκρασία 25 °C και step 2, ExBw: 10, EmBw: 10.

Πίνακας 8: Μήκη κύματος διέγερσης, εκπομπής και μετατόπιση Stokes της ένωσης **32**.

λ_{abs} (nm)	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emission}}$ (nm)	Stokes shift (nm)
660	654	710	56

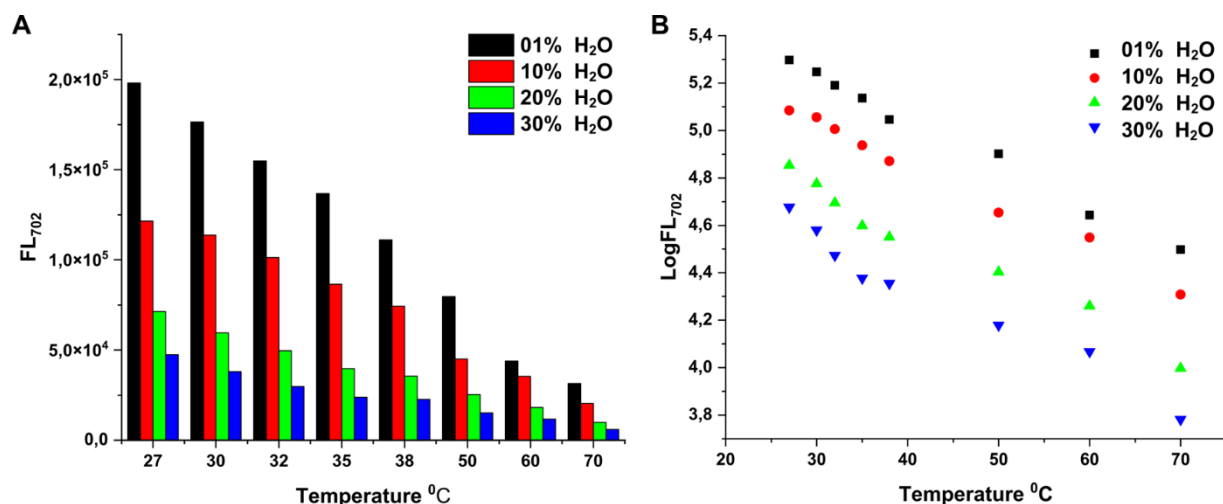
Για να αξιολογήσουμε την ανταπόκριση της ένωσης **32** στη μεταβολή του ιζώδους πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού χρησιμοποιώντας διαφορετικά δυαδικά μίγματα γλυκερόλης/νερού (από 0% έως 99%) αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου (27 °C). Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 119 Α**, η ένωση **32** σε αυτά τα υδατικά μέσα εμφανίζει ένα ασθενές σήμα φθορισμού, ενώ με σταδιακή αύξηση του ποσοστού γλυκερόλης, παρατηρήθηκε ότι το σήμα φθορισμού αυξήθηκε σημαντικά (~ **236.5 φορές**). Δεν παρατηρούμε κάποια χαρακτηριστική μετατόπιση στο κόκκινο όσο αυξάνεται η πολικότητα του διαλύτη. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι η ένωση δεν λειτουργεί μέσω του φαινομένου TICT, αλλά αποτελεί έναν ρότορα που αυξάνεται την ένταση του φθορισμού σε παχύρευστα μέσα.

Επιπλέον, η ένταση του φθορισμού εμφάνισε εξαιρετική γραμμικότητα ($R^2 = 0.981$, **Εικόνα 119 Β**) στη μεταβολή του διαλύτη από νερό σε γλυκερόλη. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ένωση **32** είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στη μεταβολή του ιζώδους και θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί σαν ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο ώστε να προσδιορίσει τη μεταβολή του ιζώδους σε ένα κυτταρικό μικροπεριβάλλον.



Εικόνα 119: Α) Φάσματα φθορισμού της ένωσης της ένωσης 32 (10 μ M) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης-νερού (από 0% έως 99% γλυκερόλη) κατόπιν διέγερσης στα 702 nm. Β) Συσχετισμός του λογάριθμου της έντασης φθορισμού στα 702 nm με τον λογάριθμο του ιξώδους (η) στο ίδιο σύστημα γλυκερόλης-νερού. κατόπιν διέγερσης στα 625 nm σε θερμοκρασία 25°C, με step 2, ExBw: 2.5, EmBw: 2.5.

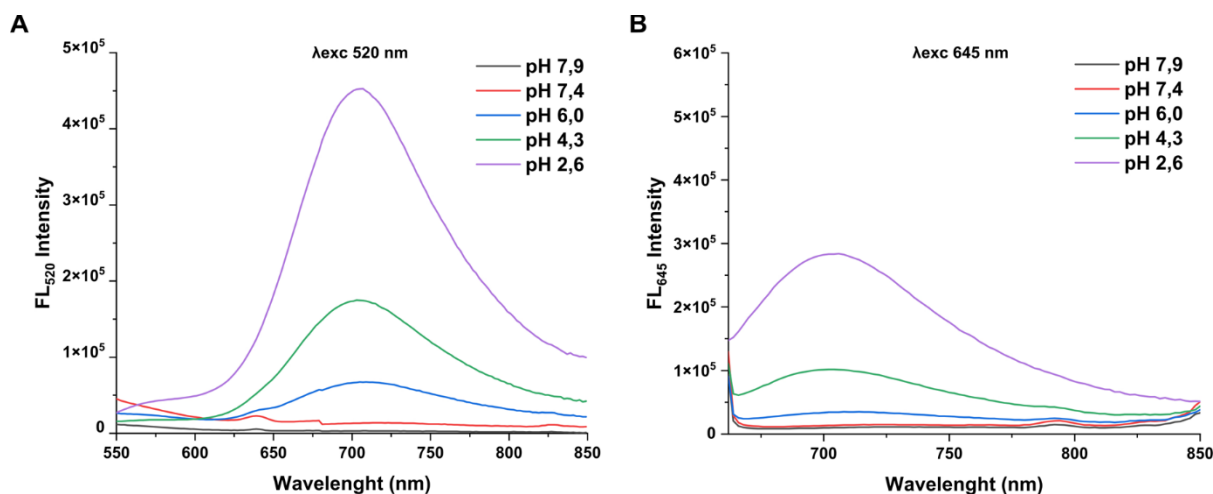
Στη συνέχεια, δεδομένου πως το ιξώδες επηρεάζεται σημαντικά από τη μεταβολή της θερμοκρασίας πραγματοποιήθηκαν συμπληρωματικές μελέτες σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 120 Α**, η διαφορά της έντασης του σήματος φθορισμού της ένωσης 32 στα διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού διατηρείται παρά το γεγονός ότι η θερμοκρασία αυξάνεται σημαντικά από 27 °C σε 70 °C. Επιπλέον, όπως απεικονίζεται και στην **Εικόνα 120 Β** η μεταβολή του λογαρίθμου της έντασης του φθορισμού εμφανίζεται μεγάλη γραμμικότητα ανεξάρτητα του δυαδικού συστήματος γλυκερόλης/νερού, άρα η αύξηση της έντασης του φθορισμού αφορά αποκλειστικά το ιξώδες και όχι αύξηση της διαλυτότητας της ουσίας στην γλυκερόλη, αφού αύξηση της διαλυτότητας θα οδηγούσε σε πιο έντονο φθορισμό ενώ παρατηρείται το αντίθετο φαινόμενο.



Εικόνα 120: Α) Συσχέτιση της μεταβολής της έντασης του φθορισμού FL_{702} της ένωσης 32 (10 μ M) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού με τη θερμοκρασία Β) Συσχέτιση του λογαρίθμου έντασης του φθορισμού FL_{702} (10 μ M) της ένωσης 32 και της θερμοκρασίας στα διαφορετικά συστήματα γλυκερόλης/νερού., με step 2, ExBw: 2.5, EmBw: 2.5.

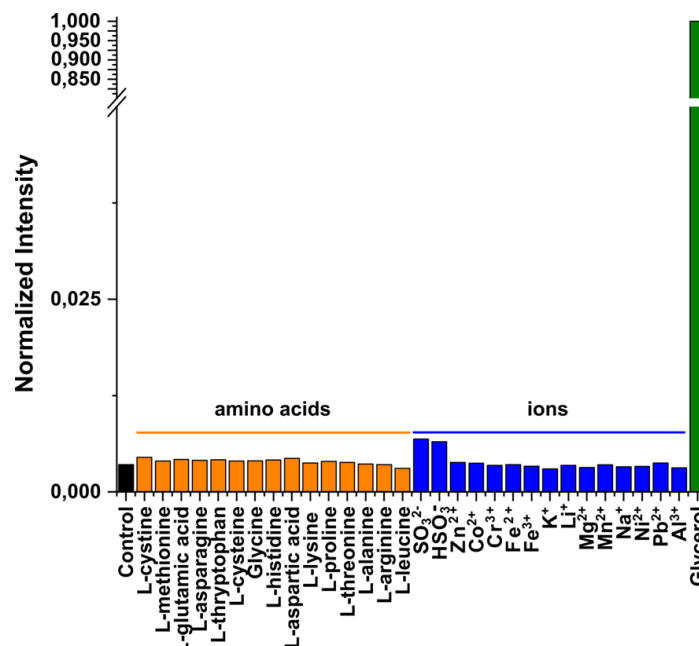
Ακολούθησαν πειράματα σε διαφορετικά pH. Προκειμένου να λάβουν χώρα τα πειράματα προετοιμάστηκαν διαλύματα από Citrate Buffer διαφορετικού pH [Stocks solutions: Α) 0.1 M

solution of citric acid, B) 0.1 M solution of sodium citrate] [123]. Από τα αποτελέσματα παρατηρούμε αύξηση της έντασης φθορισμού, σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης, όσο μειώνεται το pH. Πιο συγκεκριμένα με λ_{exc} στα 520 nm παρατηρήθηκε αύξηση του φθορισμού κατά **περίπου 143 φορές** και με λ_{exc} στα 645 nm παρατηρήθηκε αύξηση του φθορισμού κατά **περίπου 28 φορές**. Δηλαδή, η ένταση θα παρουσιάζει εντονότερο φθορισμό σε καρκινικό μικροπεριβάλλον. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην πρωτονίωση της διαιθυλάμινο- ομάδας του χρωμοφόρου πυρήνα, που σημαίνει αλλαγή της φύσης του ενός δότη της χρωστικής, όπως δηλαδή και στην προηγούμενη χρωστική.



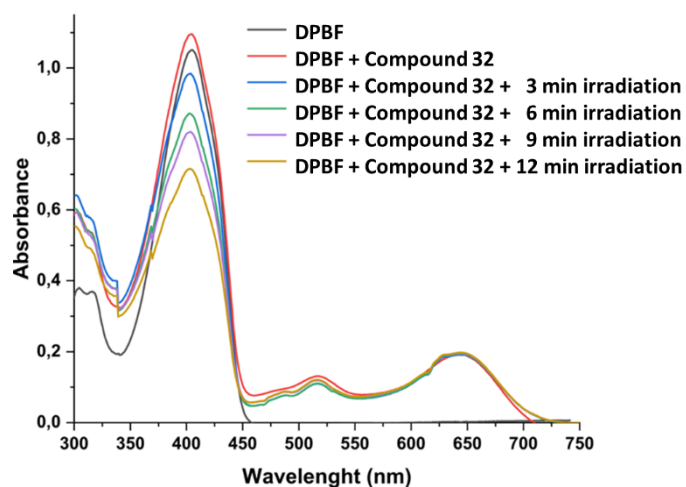
Εικόνα 121: Φάσματα φθορισμού της ένωσης της ένωσης 32 (10 μM) σε διαφορετικά pH (από 2.6 έως 7.9) κατόπιν διέγερσης στα 520 και 645 nm, και με λ_{em} τα 705 nm σε θερμοκρασία 25°C., με step 2, ExBw: 10, EmBw: 10. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί buffer phosphate-citrate.

Έπειτα παρουσιάζονται τα πειράματα εκλεκτικότητας της ένωσης παρουσία διαφορετικών αναλυτών συμπεριλαμβανομένων μετάλλων (K^+ , Na^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{4+} , Al^{3+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Sb^{3+} , Sn^{4+}), αμινοξέων (ιστιδίνη, λευκίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, προλίνη, θρεονίνη, τρυπτοφάνη, κυστεΐνη, γλουταμινικό οξύ, γλουταμίνη, γλυκίνη, γλουταθειόνη, αλανίνη, αργινίνη, ασπαραγίνη, ασπαρτικό οξύ) και φυσικά της γλυκερόλης. Η αξιολόγηση έλαβε χώρα με φασματοσκοπία φθορισμού παρακολουθώντας την μεταβολή στα 702 nm. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 122**, ο λόγος αυτός δεν εμφάνισε ιδιαίτερη μεταβολή με την προσθήκη άλλων αναλυτών (100 μM) πέραν της γλυκερόλης, υποδεικνύοντας υψηλή εκλεκτικότητα της ένωσης σε μεταβολές του ιζώδους.



Εικόνα 122: Απόκριση του σήματος φθορισμού (I/I_0 στα 702 nm) της ένωσης **32** (10 μ M) έναντι διάφορων αναλυτών (100 μ M), με PBS buffer (Phosphate-buffered saline, 10 mM, pH 7.4) σε θερμοκρασία 25 $^{\circ}$ C και step 2, ExBw: 2, EmBw: 2.

Τέλος, θελήσαμε να εξετάσουμε την εν δυνάμει κυτταροτοξικότητα του μορίου μετά από ακτινοβολήση, μέσω φασματοσκοπίας ορατού υπεριώδους σε διάλυμα της ένωσης σε CH_2Cl_2 . Πιο συγκεκριμένα, αρχικά λήφθηκε ένα φάσμα του DPBF σε CH_2Cl_2 με συγκέντρωση τέτοια ώστε η απορρόφηση του να είναι ~1 (0.05 mM). Στη συνέχεια στο ίδιο διάλυμα προστέθηκε η ένωση **32** ώστε η απορρόφηση της να είναι ~0.2 στα 520 nm και ακολούθησε καταγραφή του φάσματος του μίγματος των δύο ενώσεων. Τέλος το μίγμα αυτό ακτινοβολήθηκε υπό ανάδευση για διάφορα χρονικά διαστήματα, ενώ ενδιάμεσα καταγράφονταν τα φάσματα απορρόφησης. Παρατηρούμε ότι για το χρονικό διάστημα από 0 έως 12 λεπτά ακτινοβολήσης η ένταση της κορυφής του DPBF μειώνεται γεγονός που σημαίνει ότι παράγονται δραστικές ρίζες μονήρους οξυγόνου και το ίδιο καταναλώνεται. Από την άλλη η ένταση της ένωσης δεν επηρεάζεται από την ακτινοβολήση επομένως θα λέγαμε ότι είναι φωτοσταθερή.

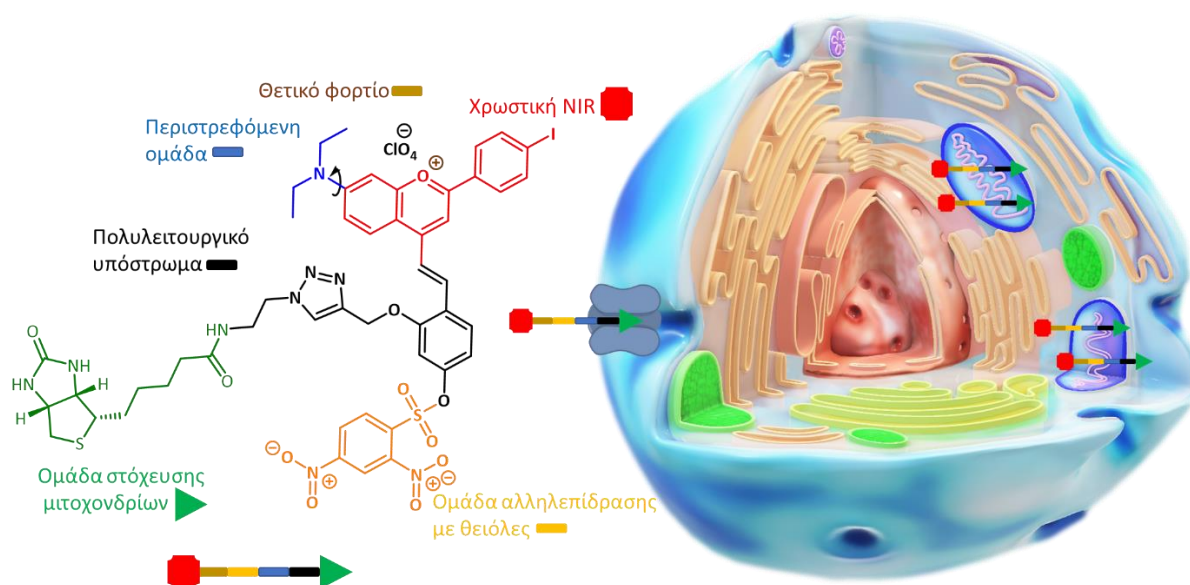


Εικόνα 123: Απόκριση του σήματος απορρόφησης της ένωσης **32** (10 μ M) και του μίγματος της ένωσης **32** και του DPBF έναντι διαφορετικών χρόνων ακτινοβολήσης.

Συμπερασματικά λοιπόν, συνθέσαμε μια NIR χρωστική, σε σύγκριση με την προηγούμενη αφού και οι δύο ενώσεις σχεδιάστηκαν με τον ίδιο σκοπό. Φαίνεται και αυτή να παρουσιάζει εξαιρετικές φωτοφυσικές ιδιότητες και εξαιρετική εκλεκτικότητα στο ιώδες και την πολικότητα. Η ανταπόκριση δεν είναι τόσο έντονη αλλά η ένωση αυτή έχει περισσότερες πιθανότητες να συσσωρεύεται εκλεκτικά στα μιτοχόνδρια. Επίσης, αναμένουμε εξαιρετική ιστική διείσδυση και δυνατότητα κυτταροτοξικότητας. Απορροφά φως εντός της περιορισμένης περιοχής της NIR ακτινοβολίας με ενέργεια ικανή να δημιουργεί ρίζες οξυγόνου στην απλή κατάσταση, και έτσι μπορεί να χαρακτηριστεί ως εξαιρετικό θεραπευτικό εργαλείο.

2.4 Σχεδιασμός, σύνθεση και αξιολόγηση θεραπευτικής ένωσης που εισέρχεται στα καρκινικά κύτταρα μέσω υποδοχέα βιοτίνης, ανταποκρίνεται σε βιοθειόλες και σε μεταβολές του ιξώδους

Αρχικά πραγματοποιήθηκε σύνθεση ενός νέου πολυλειτουργικού υποστρώματος (ένωση **36**), το οποίο φέρει στο σκελετό του ταυτόχρονα: i) μια αλδεΐδη που επιτρέπει την ενσωμάτωση κάποιου παράγοντα απεικόνισης, μέσω συμπύκνωσης τύπου Knoevenagel [102], ii) μια τελική ομάδα αλκινίου, που επιτρέπει τη σύζευξη με βιοδραστικά μόρια μέσω click χημείας καταλυόμενης από χαλκό (Huisgen Reaction [103]) και iii) μία υδροξυλική ομάδα που επιτρέπει πυρηνόφιλες αντιδράσεις με κάποια ομάδα που να ανταποκρίνεται ειδικά σε κάποιο ερέθισμα, ή διαφορετικά σε κάποιο βιοδείκτη των κυττάρων στόχων (καρκινικά ή γηρασμένα κύτταρα). Ακολούθησε σε ένα πρώτο βήμα η συμπύκνωση μεταξύ του χρωμοφόρου τμήματος και του νέου πολυλειτουργικού υποστρώματος, ώστε να προκύψει η χρωστική ένωση **41**. Στη συνέχεια, προκειμένου οι διαγνωστικές ενώσεις να ανταποκρίνονται στο μικροπεριβάλλον του καρκινικού κυττάρου και πιο συγκεκριμένα στα αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης που διαθέτει, πραγματοποιήθηκε μια αντίδραση S_N2 υποκατάστασης με το 2,4-δινιτροβενζολοσουλφονυλοχλωριδίο, μια δραστική ομάδα που αφενός ανταποκρίνεται σε βιοθειόλες όπως η γλουταθειόνη και η κυστεΐνη και αφετέρου προκαλεί μεταβολή στον φθορισμό καθώς απομακρύνεται από την χρωστική. Τέλος, πραγματοποιήθηκε καταλυόμενη από χαλκό 1,3 κυκλοπροσθήκη μεταξύ αυτής της χρωστικής και της ομάδας στόχευσης, που στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι μια τροποποιημένη μορφή της βιοτίνης και στοχεύει τους υποδοχείς αυτούς των κυττάρων. Αλληλεπίδραση της ομάδας στόχευσης με τον υποδοχέα βιοτίνης θα οδηγήσει σε ενδοκύτωση. Στη συνέχεια, το θετικό φορτίο θα μπορούσε να στοχεύει τα μιτοχόνδρια στα οποία υπερεκφράζεται η γλουταθειόνη. Αλλαγή του φθορισμού μετά από αλληλεπίδραση με τον βιοδείκτη αποτελεί ένδειξη εντοπισμού της ένωσης σε καρκινικό μικροπεριβάλλον οπότε ακτινοβολήση θα οδηγήσει σε θανάτωση των κυττάρων στόχων.

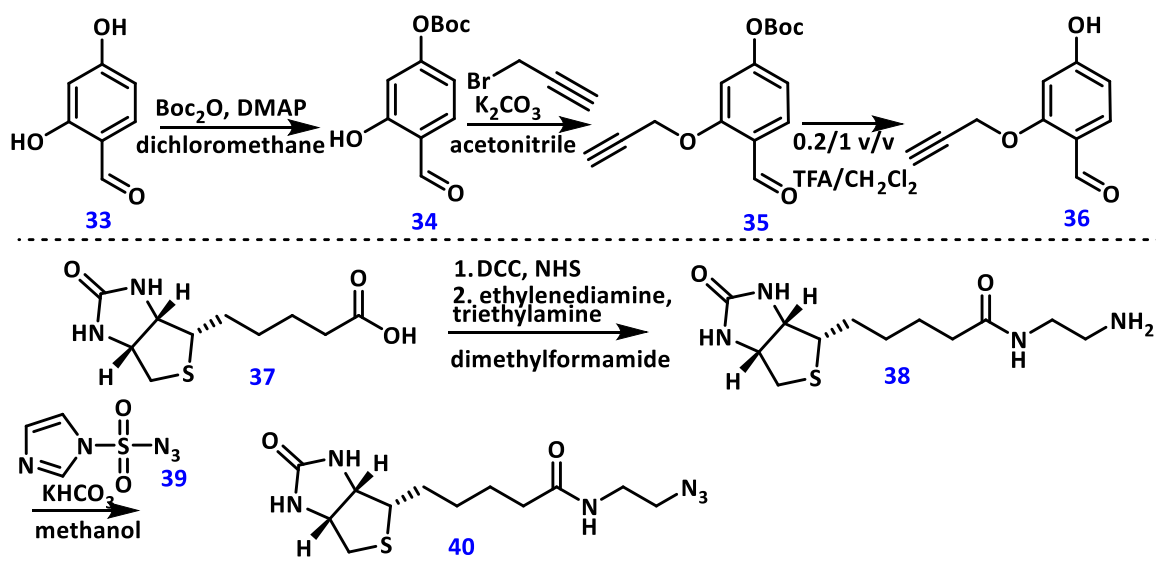


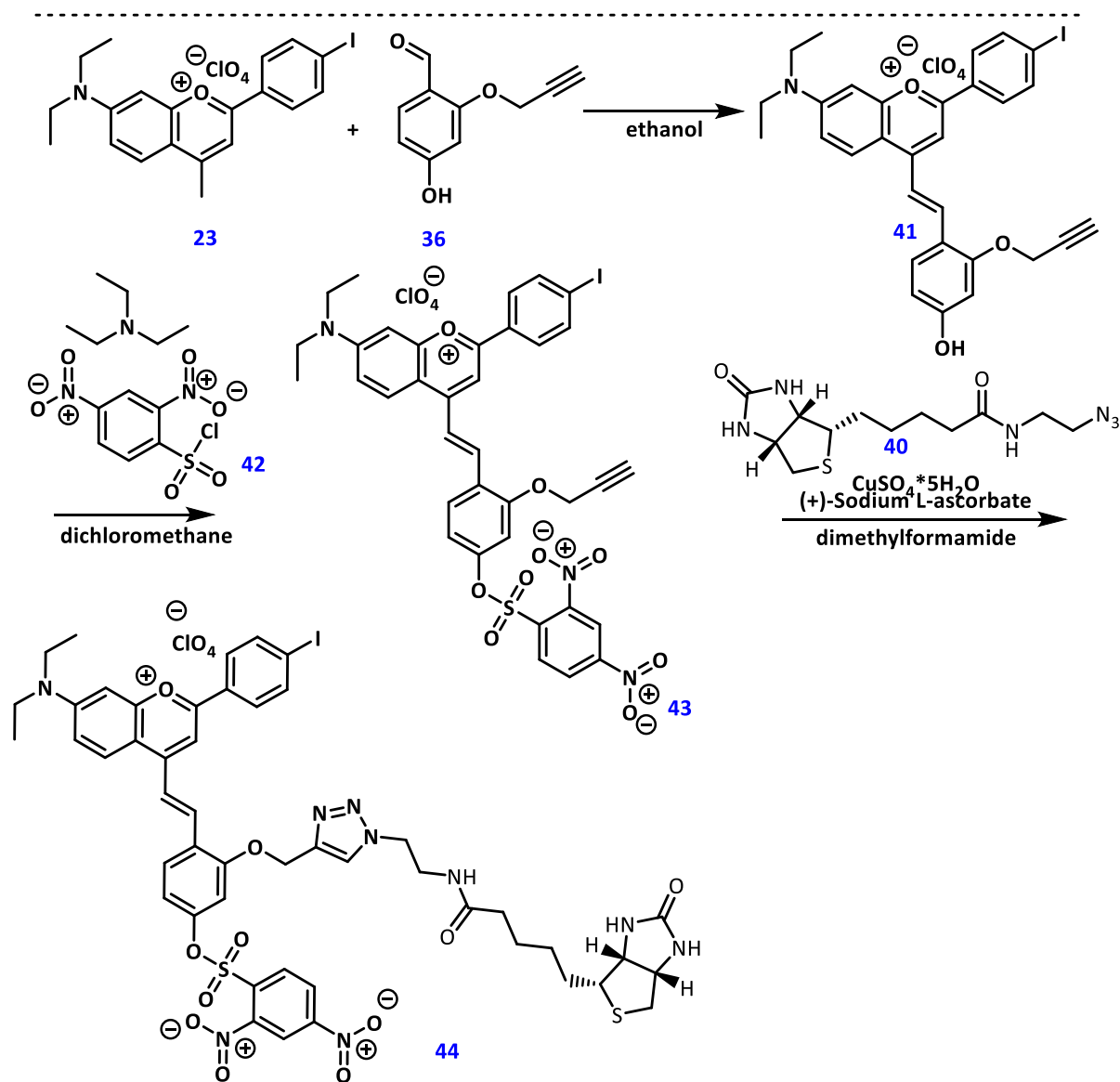
Εικόνα 124: Σχηματική αναπαράσταση των δομικών συστατικών και του προτεινόμενου τρόπου δράσης της διαγνωστικής ένωσης 44.

2.4.1 Συνθετική πορεία της διαγνωστικής ένωσης 44

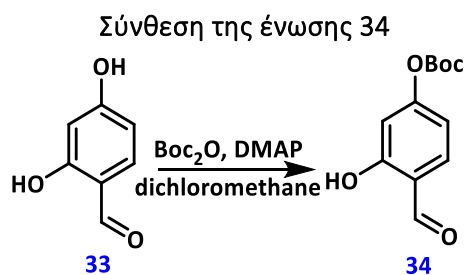
Επομένως, συνθέσαμε μια θεραπευογνωστική ένωση με φθοροφόρο σκελετό την νεοσυνθετιμένη χρωστική στην οποία συνδέθηκε ένα μόριο που ανταποκρίνεται σε ερεθίσματα βιοθειόλης και το προκύπτουν μόριο μετά την αλληλεπίδραση παρουσιάζει μεταβολή του φθορισμού σε μεταβολή του ιξώδους. Πιο συγκεκριμένα, η χρωστική διαθέτει:

1. φθοροφόρο σκελετό τύπου άλατος φλαβυλίου, που εκπέμπει στην περιοχή του εγγύς υπέρυθρου και διαθέτει ιδιότητες φωτοευαισθητοποιητή,
2. ομάδα στόχευσης για υποδοχείς βιοτίνης,
3. και ομάδα ενεργοποίησης που ανταποκρίνεται σε βιοθειόλες όπως η κυστεΐνη και η γλουταθειόνη.





Εικόνα 125: Πειραματική πορεία σύνθεσης της θεραπευτικής ένωσης 44

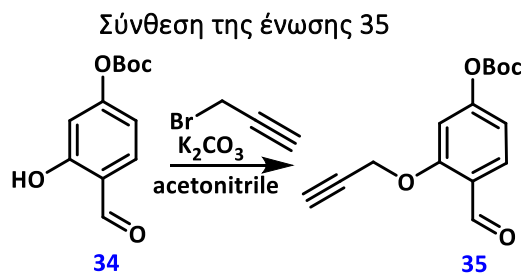


Εικόνα 126: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 34.

Σε ένα αιώρημα της 2,4 διυδρόξυβενζαλδεΐδης (2.76 g, 30.01998 mol) και N,N διμεθυλοαμινοπυριδίνης (277 mg, 0.001998 mol) σε άνυδρο CH_2Cl_2 (50 mL) πραγματοποιήθηκε σταγονομετρική προσθήκη Boc_2O (6.54 g, 0.02997 mol) διαλυμένο σε άνυδρο CH_2Cl_2 (20 mL) εντός 2 ωρών και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε για 15 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με TLC χρωματογραφία με σύστημα διαλυτών EtOAc /Hex (10% v/v). Στη συνέχεια, στο μίγμα της αντίδρασης προστέθηκε νερό (500 mL) και ακολούθησε εκχύλιση σε CH_2Cl_2 όπου συλλέχθηκε η οργανική φάση. Στη συνέχεια ξηράνθηκε με Na_2SO_4 , συμπυκνώθηκε με

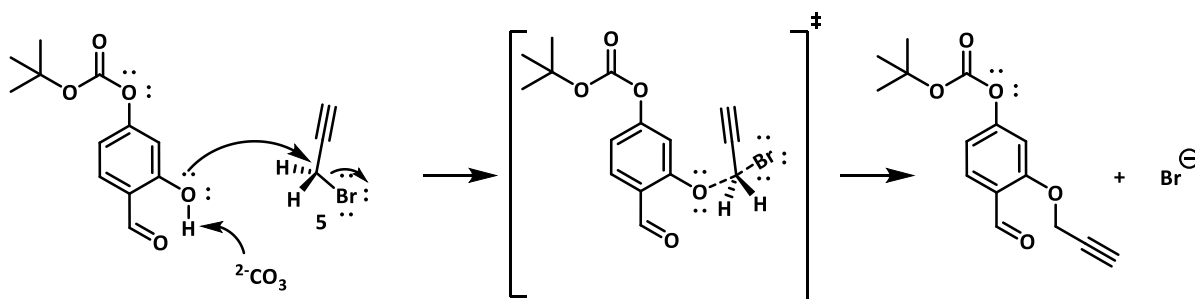
εξάτμιση υπό υψηλό κενό και ακολούθησε καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης (5% EtOAc / Hex) ώστε να παραλάβουμε το επιθυμητό προϊόν σαν λευκό στερεό (1.7 g, 36%) [126].

Ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **34** μέσω φασματοσκοπίας NMR παρατίθεται στο παράρτημα του κειμένου.



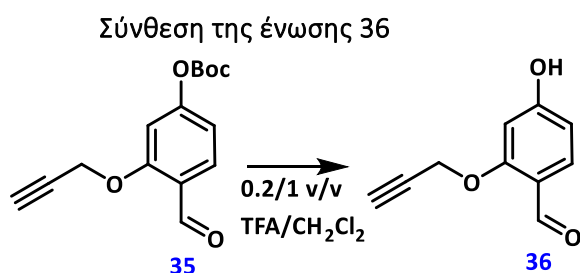
Εικόνα 127: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 35.

Σε διάλυμα της ένωσης **34** (100 mg, 0.4197 mmol) και άνυδρου ανθρακικού καλίου (173.9 mg, 1.25923 mmol), σε άνυδρο MeCN (5 mL) προστέθηκε σταγονομετρικά προπαργυλοβρωμίδιο (174 mg, 1.679 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης θερμάνθηκε στους 40 °C για 16 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με TLC χρωματογραφία με σύστημα διαλυτών EtOAc / Hex (10% v/v). Αφού η αντίδραση ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, στο μίγμα της αντίδρασης προστέθηκε νερό (100 mL) και ακολούθησε εκχύλιση με EtOAc (2*50 mL). Στη συνέχεια οι οργανικές φάσεις ξηράθηκαν με άνυδρο Na₂SO₄, διηθήθηκαν και συμπυκνώθηκαν με εξάτμιση υπό υψηλή κενό όπου λάβαμε την επιθυμητή ένωση **35** ως ένα ελαφρώς καφέ λάδι (110 mg, 95%). Ακολουθεί ο προτεινόμενος μηχανισμός της αντίδρασης.



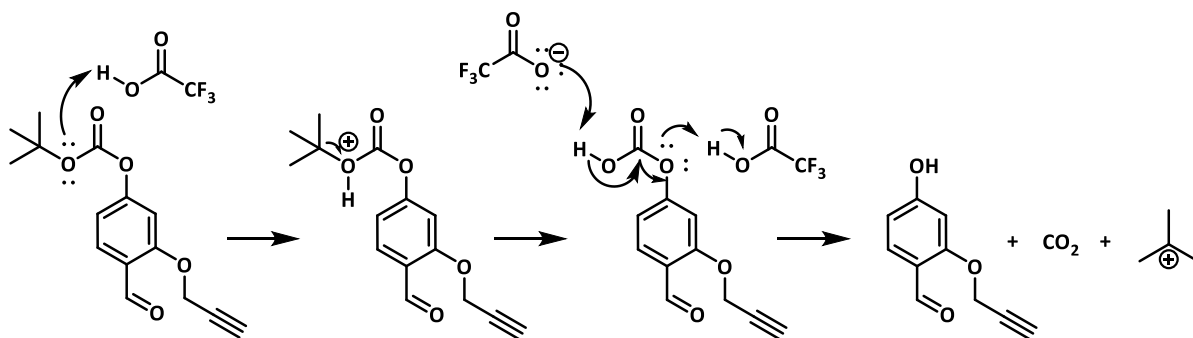
Εικόνα 128: Προτεινόμενος μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης 35, μέσω πυρηνόφιλης αντίδρασης.

Ο χαρακτηρισμός της ένωσης μέσω φασματοσκοπίας NMR παρατίθεται στο παράρτημα του κειμένου.



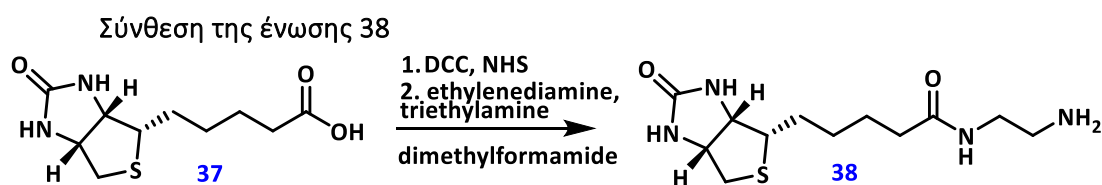
Εικόνα 129: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 36.

Σε παγωμένο διάλυμα της ένωσης **35** (100 mg, 0.3619 mmol) σε CH₂Cl₂ (20 mL), προστέθηκε σταγονομετρικά τριφθοροοξικό οξύ (5 mL) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με TLC χρωματογραφία με σύστημα διαλυτών 10% EtOAc /Hex, v/v. Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό υψηλό κενό ώστε να λάβουμε το επιθυμητό προϊόν σαν μπεζ στερεό (59 mg, 93%). Ακολουθεί ο προτεινόμενος μηχανισμός της αντίδρασης.



Εικόνα 130: Προτεινόμενος μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης **36**.

Ο χαρακτηρισμός της ένωσης **36** μέσω φασματοσκοπίας NMR παρατίθεται στο παράρτημα του κειμένου.

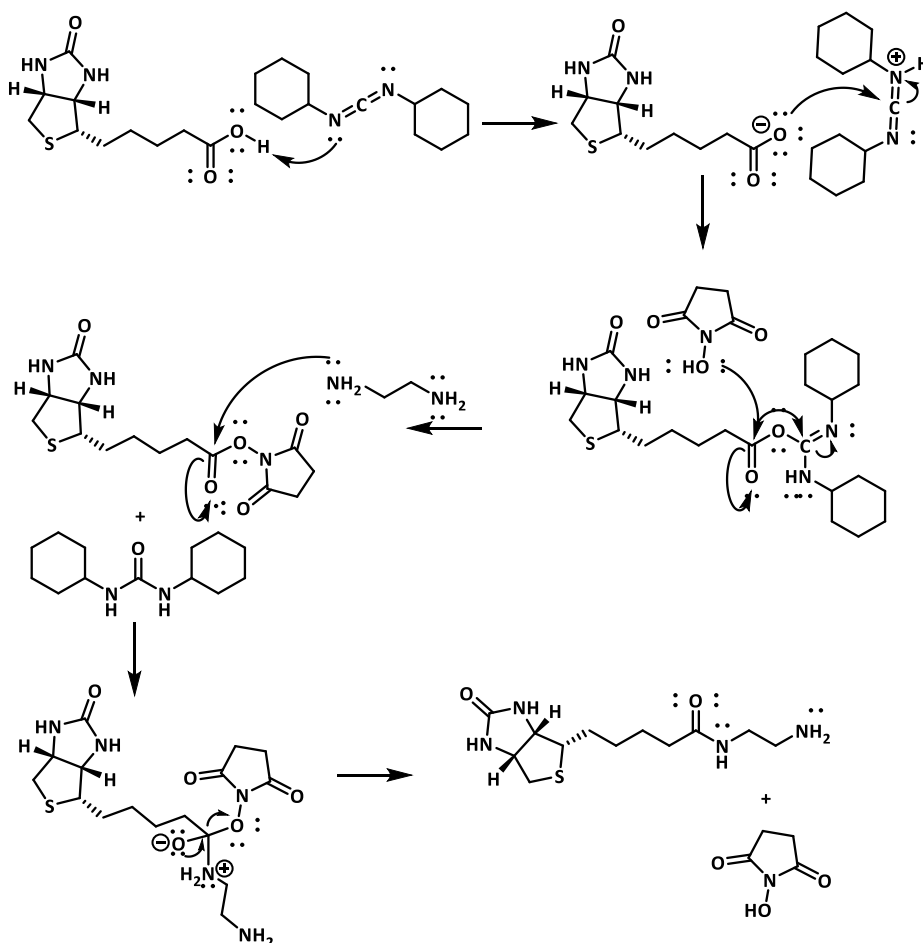


Εικόνα 131: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης **38**.

Σε ένα διάλυμα D-βιοτίνης (**37**) (100 mg, 0.41 mmol) υπό ανάδευση, σε άνυδρο DMF (4 mL) προτέθηκαν N,N'-δικυκλοεξυλκαρβοδιιμίδιο (DCC) (168 mg, 0.82) και N-υδροξυηλεκτριμίδιο (NHS) (47 mg, 0.82 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 ώρες. Στη συνέχεια το ίζημα που σχηματίστηκε διηθήθηκε και εκπλύθηκε δύο φορές με DMF (2*5 mL). Το διήθημα συμπυκνώθηκε υπό κενό και εκπλύθηκε σχολαστικά με παγωμένο διαιθυλαιθέρα ώστε να προκύψει το επιθυμητό προϊόν σαν λευκό στερεό (70 mg, 51.5%).

Το πρωτονιακό του φάσμα NMR παρατίθεται στο παράρτημα του κειμένου.

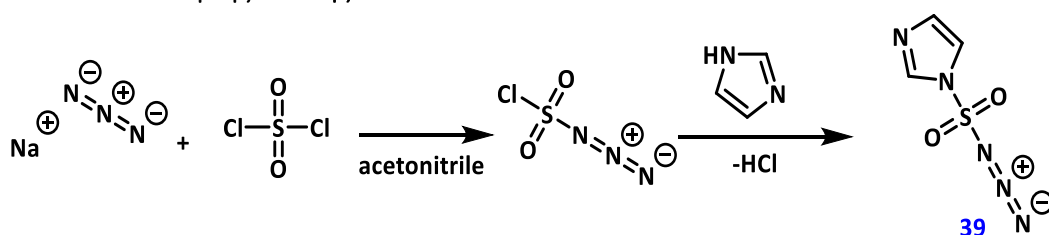
Στη συνέχεια, σε παγωμένο διάλυμα του ενεργοποιημένου εστέρα της ένωσης (70 mg, 0.253 mmol) σε άνυδρο DMF (4 mL) προστέθηκε σταγονομετρικά ένα διάλυμα τριαιθυλαμίνης (50.5 mg, 0.51 mmol) και αιθυλενοδιαμίνης (320 mg, 5.1 mmol) σε άνυδρο DMF (1 mL), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες. Στη συνέχεια, το προκύπτουν ίζημα διηθήθηκε, πλύθηκε με DMF (2*2 mL) και το διήθημα συμπυκνώθηκε υπό υψηλό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός μέσω παρασκευαστικής HPLC (από 98:2 H₂O: ACN έως 50: 50 H₂O: ACN, 214 nm) όπου λάβαμε το επιθυμητό προϊόν ως λευκό στερεό (29 mg, 40%). Ακολουθεί ο προτεινόμενος μηχανισμός της αντίδρασης.



Εικόνα 132: Προτεινόμενος μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης 38.

Ο χαρακτηρισμός της ένωσης **38** μέσω φασματοσκοπίας NMR παρατίθεται στο παράρτημα του κειμένου.

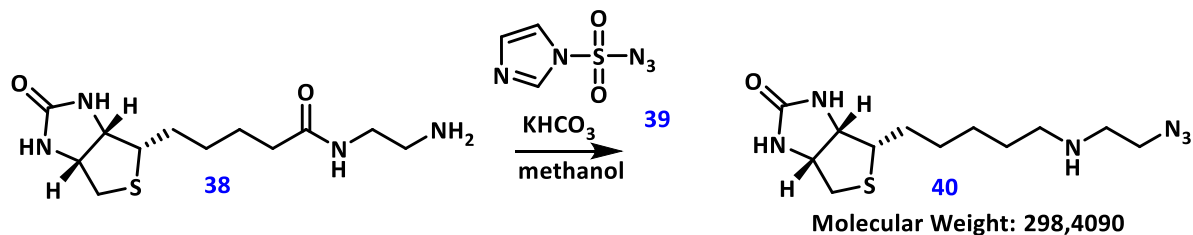
Σύνθεση της ένωσης 39



Εικόνα 133: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 39.

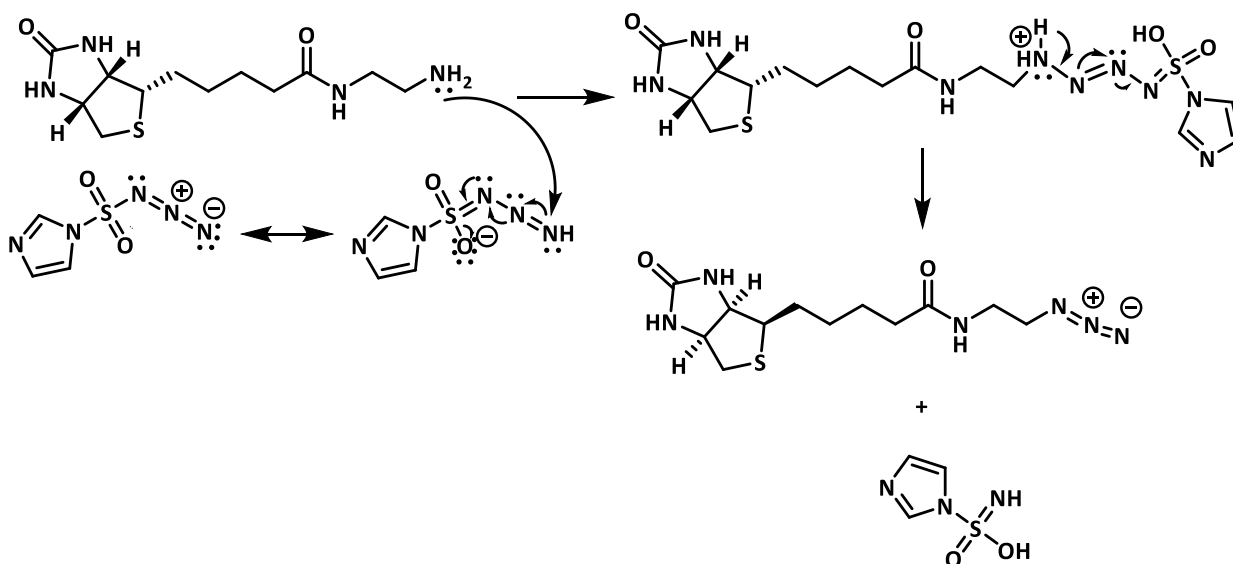
Σε παγωμένο αιώρημα NaN_3 (0.5 g, 7.69 mmol) σε MeCN (5 mL) προστέθηκε σταγονομετρικά σουλφουρυλοχλωρίδιο (0.623 mL, 7.69 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 ώρες. Στο παγωμένο μίγμα της αντίδρασης, ακολούθησε η προσθήκη του ιμιδαζολίου (1.047 g, 15.38 mmol) και η αντίδραση αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Στη συνέχεια, στο μίγμα της αντίδρασης προστέθηκε EtOAc (10 mL) και ακολούθησε εκχύλιση διαδοχικά με H_2O (10 mL) και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO_3 (2×15 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε με Na_2SO_4 και συμπυκνώθηκε με εξάτμιση υπό υψηλό κενό ώστε να λάβουμε το επιθυμητό προϊόν σαν υποκίτρινο λάδι [127]. Ο χαρακτηρισμός της ένωσης **39** μέσω φασματοσκοπίας NMR παρατίθεται στο παράρτημα του κειμένου.

Σύνθεση της ένωσης 40



Εικόνα 134: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 40.

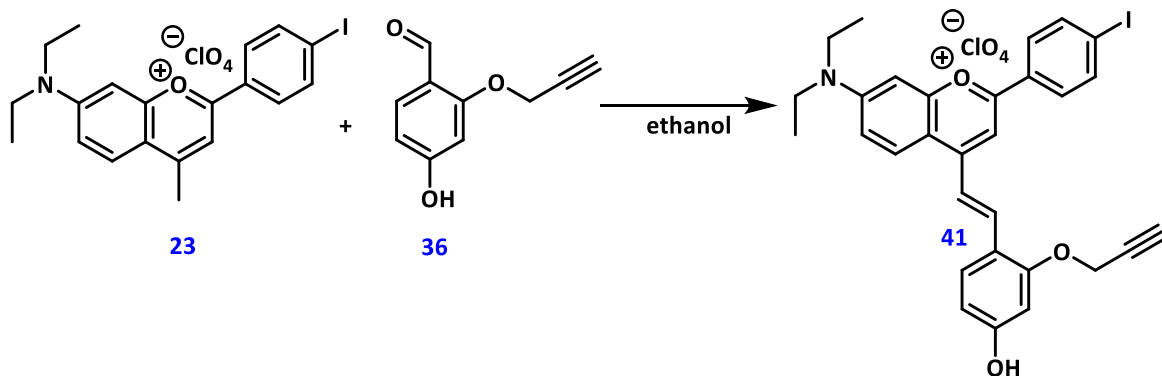
Σε ένα διάλυμα της ένωσης **38** (50 mg, 0.175 mmol), όξινου ανθρακικού νατρίου (84 mg, 0.611 mmol), σε MeOH (5 mL) προστέθηκε η ένωση **39** (36.8 mg, 0.21 mmol) και το διάλυμα αναδεύτηκε για 15 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού πραγματοποιήθηκε πλήρης κατανάλωση της ένωσης **38** ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό υψηλό κενό και το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε καθαρισμό μέσω χρωματογραφίας στήλης (10% MeOH / CH₂Cl₂) ώστε να παραλάβουμε το επιθυμητό προϊόν σαν λευκό στερεό (27.7 mg, 53%). Ακολουθεί ο προτεινόμενος μηχανισμός της αντίδρασης.



Εικόνα 135: Προτεινόμενος μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης 40.

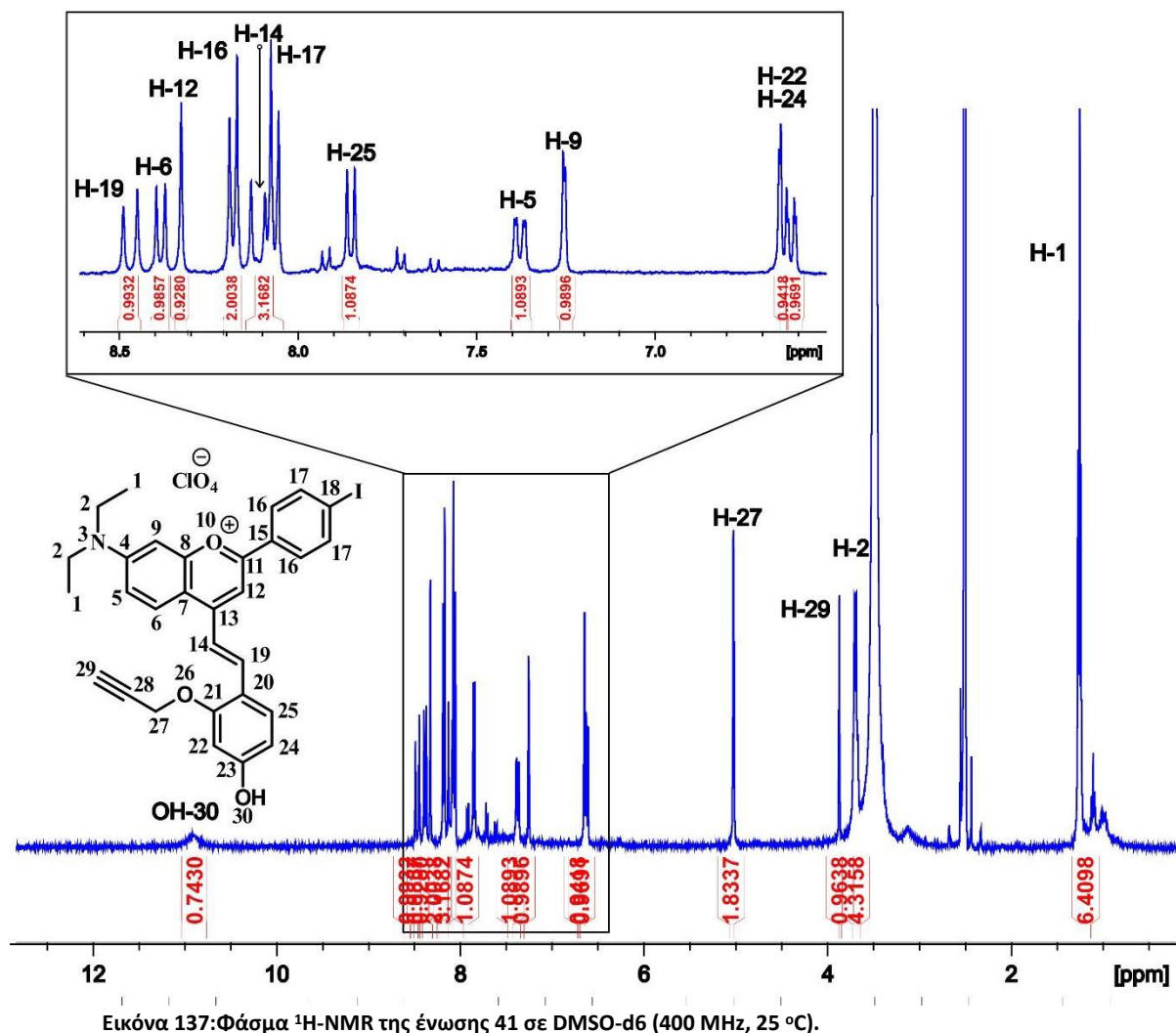
Ο χαρακτηρισμός της ένωσης **40** μέσω φασματοσκοπίας NMR παρατίθεται στο παράρτημα του κειμένου.

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 41



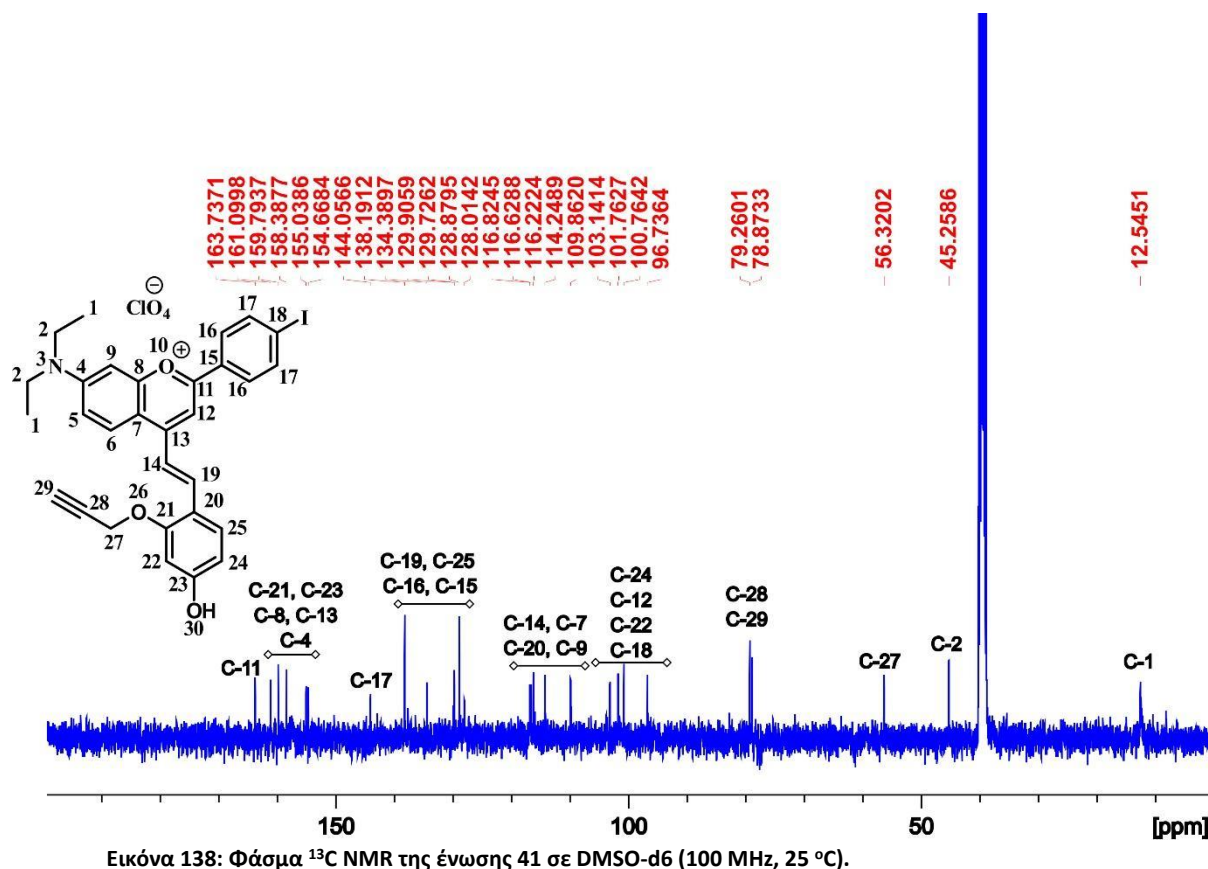
Εικόνα 136: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 41.

Σε διάλυμα της ένωσης **36** (125 mg, 0.24 mmol) προστέθηκε η ένωση **23** (42 mg, 0.14 mmol), σε αιθανόλη (4 mL) και το μίγμα της αντίδρασης θερμάνθηκε με αναρροή για 15 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με TLC χρωματογραφία με σύστημα διαλυτών MeOH/CH₂Cl₂ (5% v/v). Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό υψηλό κενό και το μίγμα της αντίδρασης υποβλήθηκε σε καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης (4% MeOH / CH₂Cl₂) ώστε να λάβουμε το επιθυμητό προϊόν σαν μωβ στερεό (67.7 mg, 41%). Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός της ένωσης **41** με φασματοσκοπία NMR.



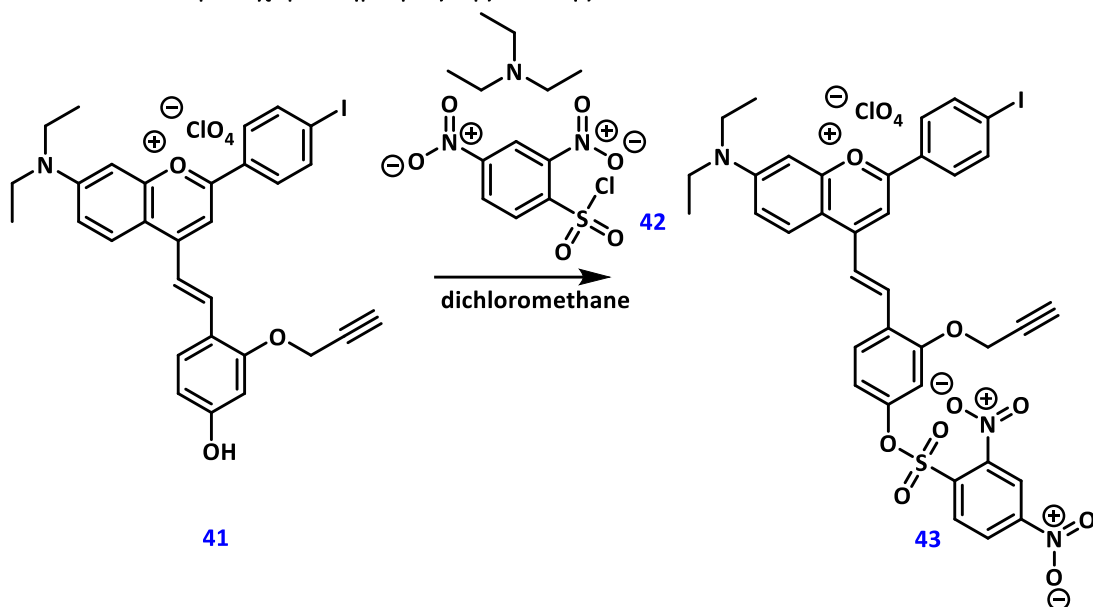
Εικόνα 137: Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης 41 σε DMSO-d₆ (400 MHz, 25 °C).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 11.06-10.77 (br, 1H, OH-30), 8.50-8.43 (d, J=15.5 Hz, 1H, H-19), 8.40-8.34 (d, J=9.74 Hz, 1H, H-6), 8.32-8.29 (s, 1H, H-12), 8.21-8.15 (d, J=8.5 Hz, 2H, H-16), 8.13-8.05 (m, 3H, H-14, H-17), 7.88-7.84 (d, J=8.6 Hz, 1H, H-25), 7.39-7.33 (dd, J=9.4 Hz, J=2.1 Hz, 1H, H-5), 7.26-7.23 (d, J= 1.7 Hz, 1H, H-9), 6.64-6.57 (m, 2H, H-22, H-24), 5.04-5.00 (d, J=1.6 Hz, 1H, H-27), 3.88-3.85 (t, J=2.1 Hz, 1H- H-29), 3.74-3.64 (dd, J=6.7 Hz, J=6 Hz, 4H, H-2), 1.28-1.21 (t, J=6.7 Hz, 6H, H-1).



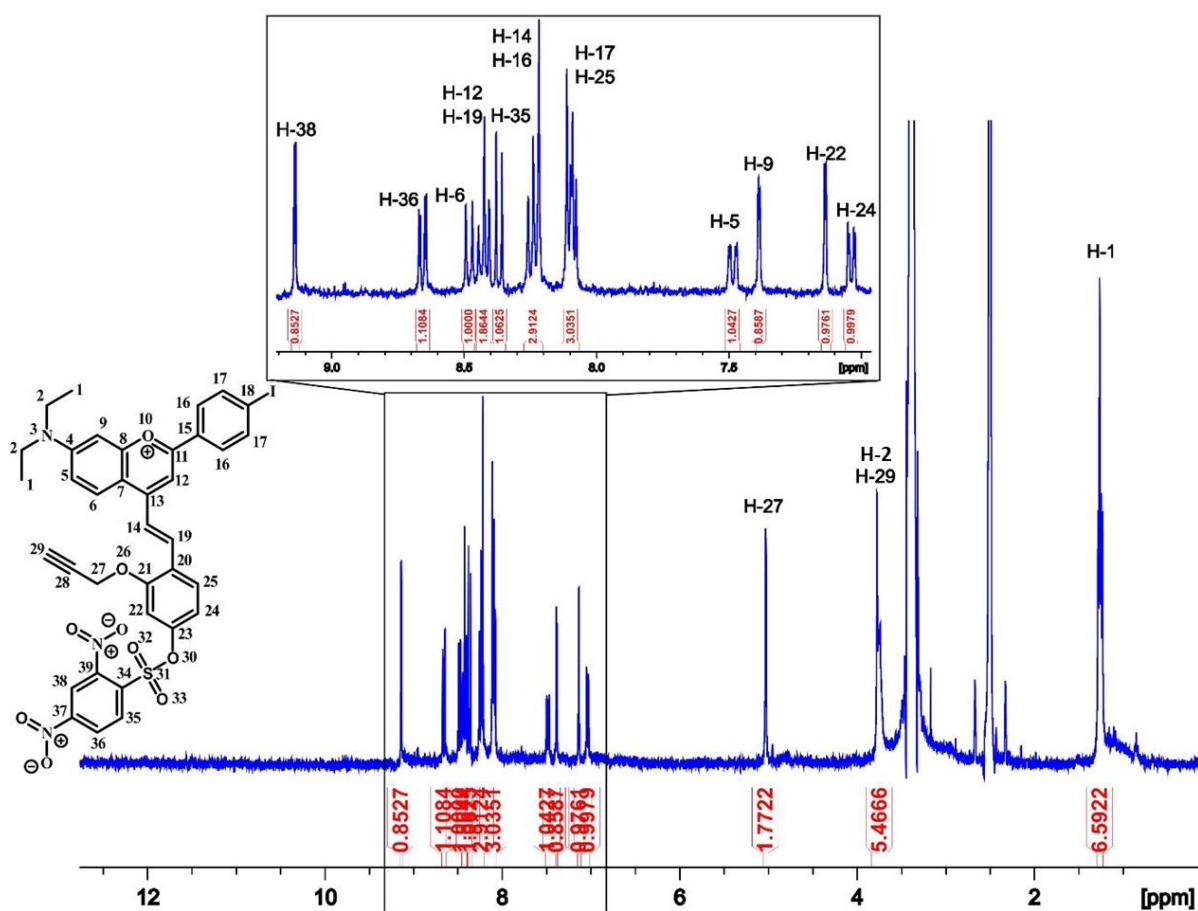
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 163.73 (C-11), 161.10 (C-21), 159.79 (C-23), 158.39 (C-8), 155.04 (C-13), 154.67 (C-4), 144.06 (C-17), 138.19 (C-19), 134.39 (C-25), 129.73 (C-16), 128.88 (C-15), 116.82 (C-14), 116.63 (C-7), 116.22 (C-20), 114.25 (C-9), 109.86 (C-5), 103.14 (C-24), 101.76 (C-12), 100.76 (C-22), 96.73 (C-18), 79.26 (C-28), 78.87 (C-29), 56.32 (C-27), 45.26 (C-2), 12.54 (C-1).

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 43



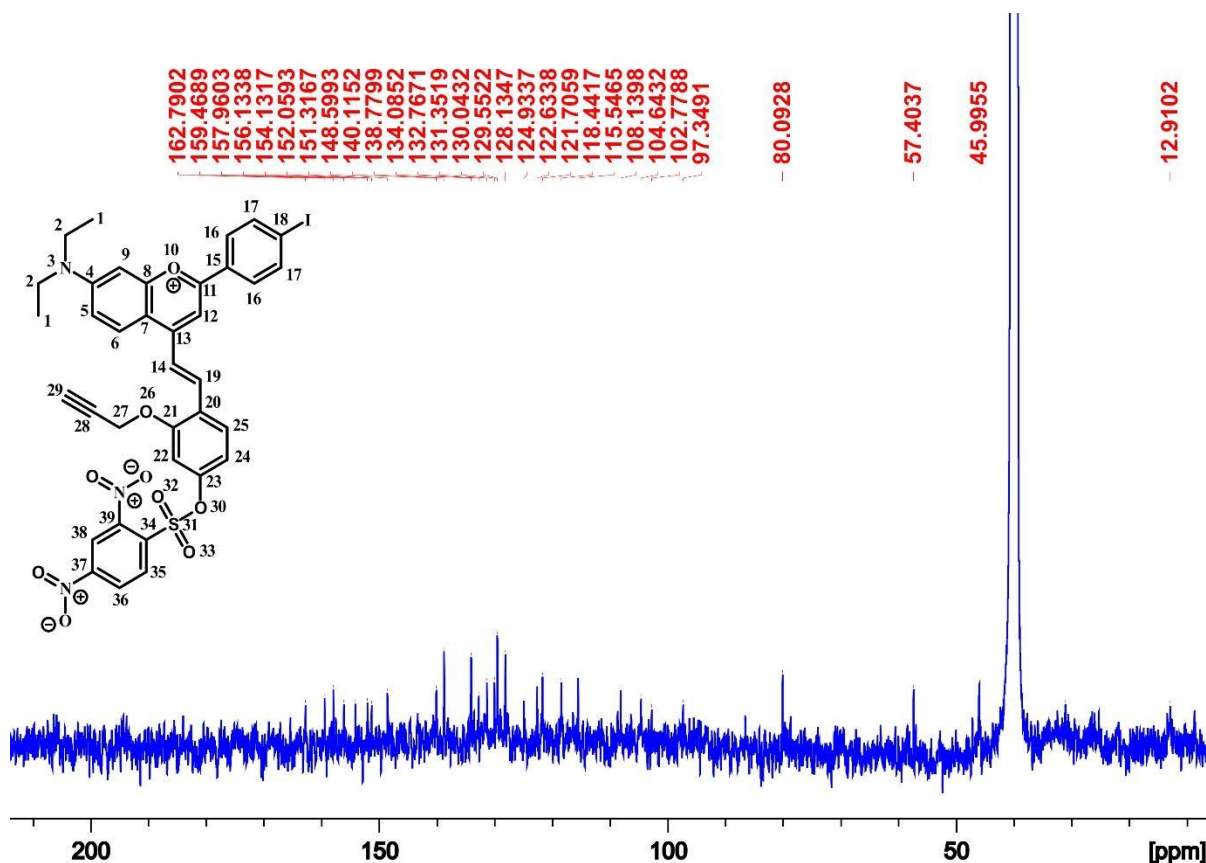
Εικόνα 139: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 43.

Σε παγωμένο διάλυμα της ένωσης **41** (48.2 mg, 0.071 mmol) σε άνυδρο CH_2Cl_2 (2 mL), προστέθηκε τριαιθυλαμίνη (30 μL , 0.21 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, ακολούθησε σταγονομετρική προσθήκη διαλύματος 2,4-δινιτροβενζολοσουλφονυλοχλωριδίου (38 mg, 0.14 mmol) σε άνυδρο CH_2Cl_2 (1 mL) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε υπό ατμόσφαιρα αζώτου επιπλέον για 2 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με TLC χρωματογραφία με σύστημα διαλυτών $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (5% v/v). Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό υψηλό κενό και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με υγρή χρωματογραφία HPLC (από 60:40 H_2O : ACN έως 0:100 H_2O : ACN, με απεικόνιση στα 550 nm) ώστε να παραλάβουμε το επιθυμητό προϊόν σαν μωβ στερεό (13 mg, 21%). Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **43** μέσω φασματοσκοπίας NMR:



Εικόνα 140: Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 43 σε DMSO-d_6 (400 MHz, 25 °C).

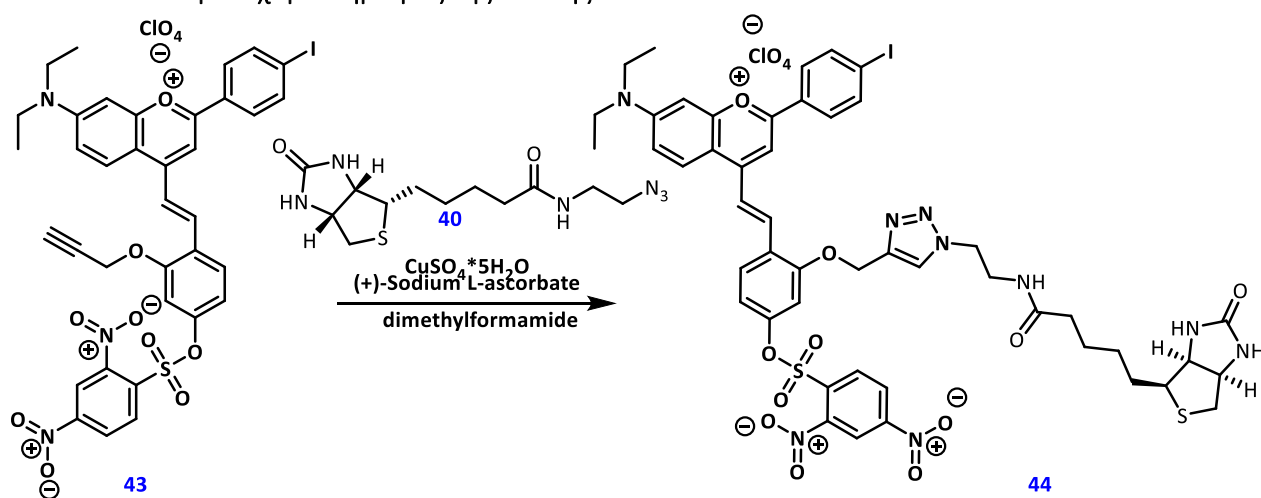
^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 9.15-9.12 (d, $J=2.26$ Hz, 1H, H-38), 8.68-8.63 (dd, $J=8.82$ Hz, $J=2.26$ Hz, 1H, H-36), 8.50-8.45 (d, $J=9.87$ Hz, 1H, H-6), 8.45-8.39 (m, 2H, H-12, H-19), 8.39-8.34 (d, $J=8.76$ Hz, 1H, H-35), 8.27-8.20 (m, 2H, H-14, H-16), 8.13-8.06 (m, 3H, H-17, H-25), 7.51-7.46 (dd, $J=9.78$ Hz, $J=2.33$ Hz, 1H, H-5), 7.40-7.37 (d, $J=2.33$ Hz, 1H, H-9), 7.15-7.11 (d, $J=2.33$ Hz, 1H, H-22), 7.06-7.01 (dd, $J=8.63$ Hz, $J=2.25$ Hz, 1H, H-24), 5.05-5.00 (d, $J=2.10$ Hz, 1H, H-27), 3.80-3.70 (m, 5H, H-2, H-29), 1.30-1.19 (m, 6H, H-1).



Εικόνα 141: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 43 σε DMSO- d_6 (100 MHz, 25 °C).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.79 (C-11), 159.47 (C-23), 157.96 (C-21), 156.13 (C-8), 154.13 (C-13), 152.06 (C-37), 151.32 (C-4), 148.60 (C-39), 140.11 (C-19), 138.78 (C-17), 134.08 (C-25), 132.76 (C-16), 131.35 (C-34), 128.88 (C-15, C-22), 129.55 (C-36), 128.13 (C-35), 124.93 (C-14), 122.63 (C-7), 118.44 (C-20), 115.55 (C-9), 108.14 (C-5), 104.64 (C-24), 102.78 (C-12), 97.35 (C-18), 70.09 (C-28, C-29), 57.40 (C-27), 45.99 (C-2), 12.91 (C-1).

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 44

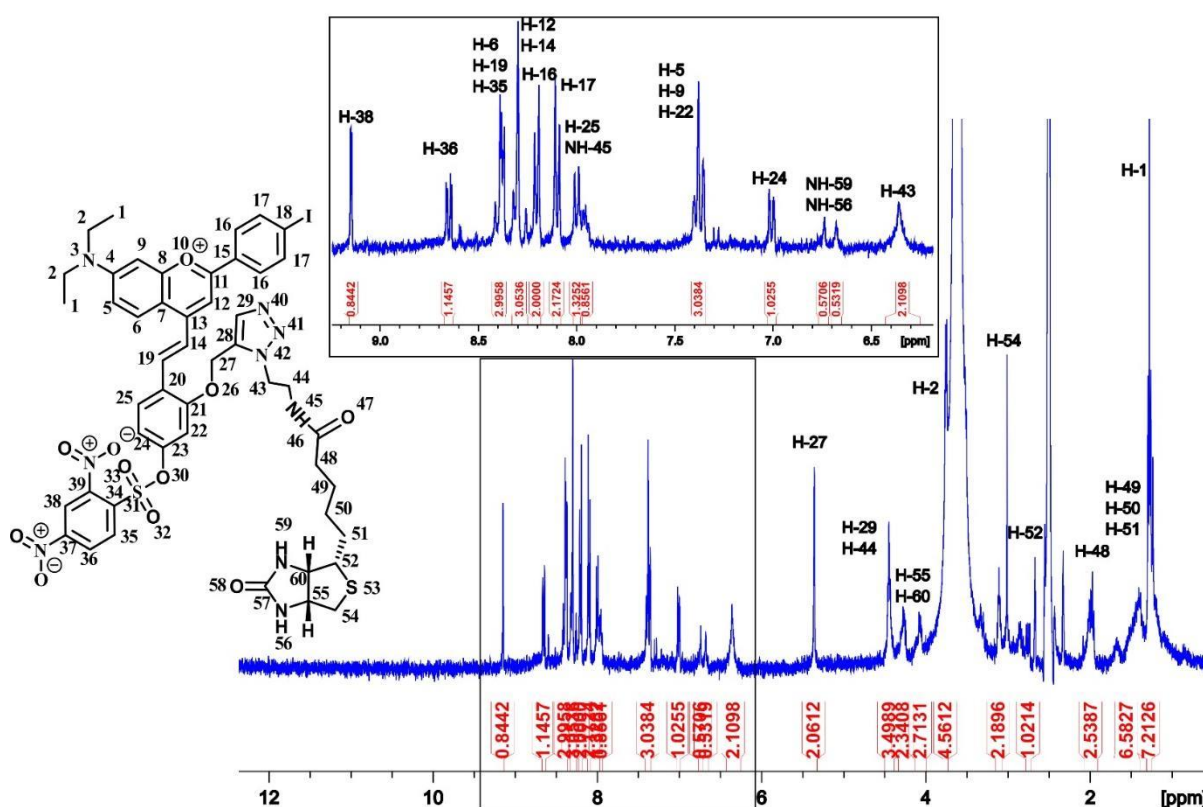


Εικόνα 142: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 44.

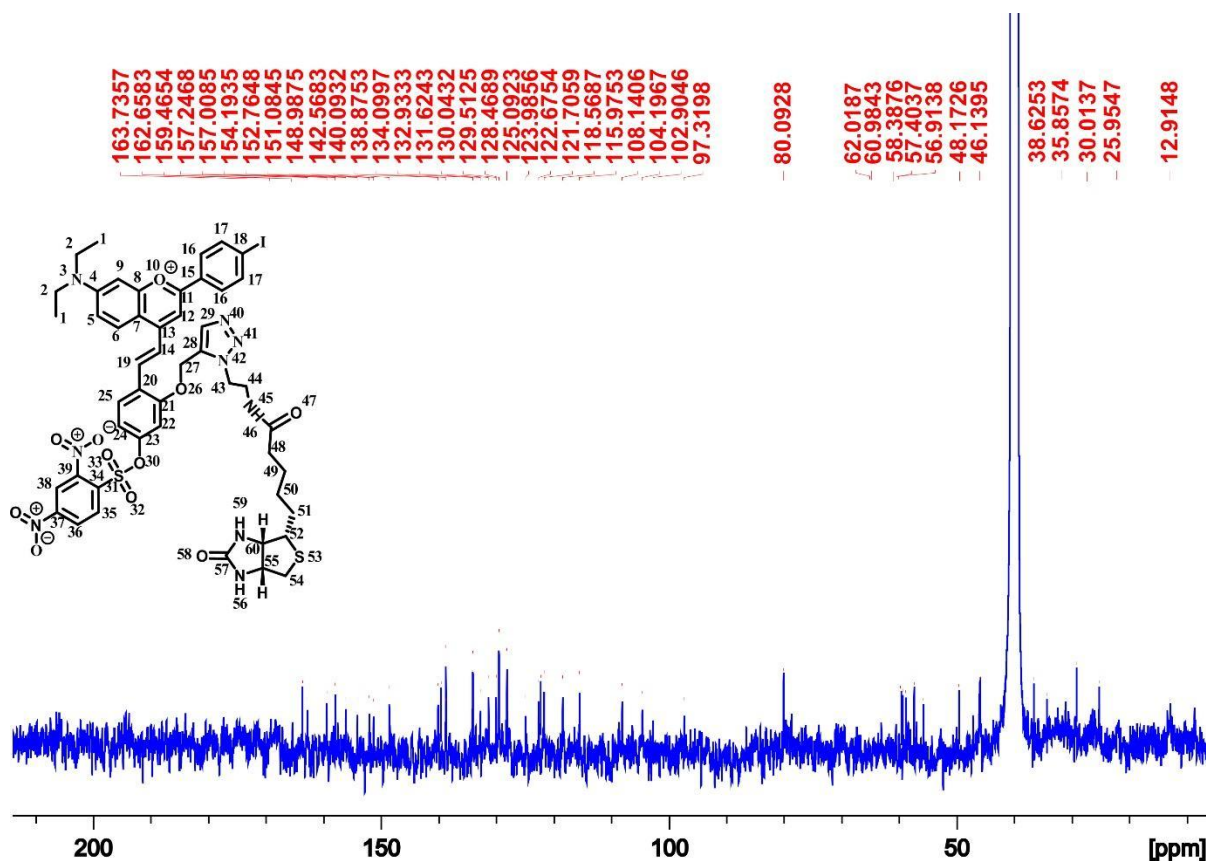
Σε ένα διάλυμα της ένωσης **43** (10.6 mg, 0.012 mmol) σε DMF (2 mL DMF), προστέθηκε καταλυτική ποσότητα διοθενούς χαλκού ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.22 mg, 0.0009 mmol) και καταλυτική

ποσότητα ασκορβικού νατρίου (AsCONa, 0.46 mg, 0.0023 mmol) αργότερα ακολούθησε η προσθήκη της ένωσης **40** (11 mg, 0,035 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με TLC χρωματογραφία με σύστημα διαλυτών MeOH/EtOAc (15% v/v). Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό υψηλό κενό. Το ακατέργαστο προϊόν καθαρίστηκε με υγρή χρωματογραφία HPLC (από 65:35 H₂O: ACN έως 10:90 H₂O: ACN, με απεικόνιση στα 254 nm) για να δώσει ένα μωβ στερεό (3.4 mg, 24%).

Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός της ένωσης **44** μέσω φασματοσκοπίας NMR και φασματομετρίας μάζας.

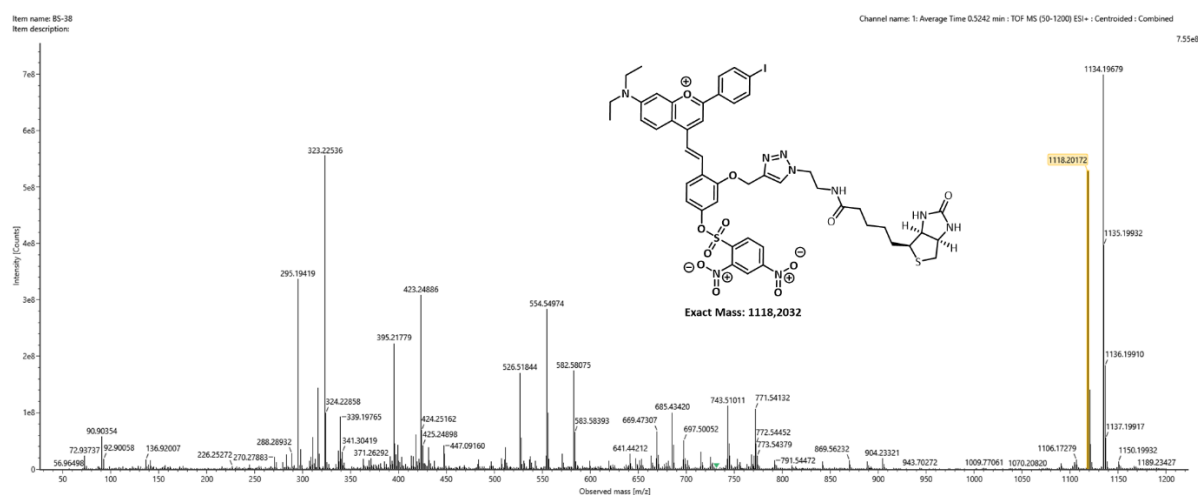


¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 9.16-9.14 (d, J=2.26 Hz, 1H, H-38), 8.67-8.63 (dd, J=8.80 Hz, J=2.26 Hz, 1H, H-36), 8.42-8.36 (m, 3H, H-6, H-19, H-35), 8.33-8.25 (m, 2H, H-12, H-14), 8.22-8.18 (d, J=8.6 Hz, 2H, H-16), 8.12-8.08 (d, J=8.60 Hz, 2H, H-17), 8.08-7.98 (d, J=8.58 Hz, 1H, H-25), 7.97-7.94 (m, 1H, NH-45), 7.42-7.34 (m, 3H, H-5, H-9, H-22), 7.03-6.68 (dd, J=8.76 Hz, J=1.87 Hz, 1H, H-24), 6.77-6.72 (br, 1H, NH-59), 6.70-6.65 (br, 1H, NH-56), 6.43-6.25 (br, 2H, H-43), 5.40-5.32 (s, 1H, H-27), 4.50-4.39 (m, 3H, H-29, H-44), 4.33-4.22 (m, 1H, H-55), 4.13-3.99 (m, 1H, H-60), 3.78-3.73 (m, 4H, H-2), 2.78-2.71 (m, 1H, H-52), 2.07-1.90 (m, 2H, H-48), 1.71-1.38 (m, 6H, H-49, H-50, H-51), 1.31-1.23 (m, 6H, H-1).



Εικόνα 144: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 44 σε DMSO- d_6 (100 MHz, 25 °C).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.73 (C-57), 162.66 (C-11), 159.47 (C-23), 157.25 (C-21), 157.01 (C-8), 154.19 (C-13), 152.76 (C-37), 151.08 (C-4), 148.99 (C-39), 142.56 (C-28), 140.09 (C-19), 138.87 (C-17), 134.10 (C-25), 132.93 (C-16), 131.62 (C-34), 130.04 (C-15, C-22), 129.51 (C-36), 128.47 (C-35), 125.09 (C-14), 123.98 (C-27), 122.67 (C-7), 118.57 (C-20), 115.98 (C-9), 108.14 (C-5), 104.20 (C-24), 102.90 (C-12), 97.32 (C-18), 62.01 (C-27), 60.98 (C-60), 58.39 (C-55), 56.91 (C-52), 46.14 (C-2), 48.17 (C-43), 38.62 (C-54), 35.86 (C-48), 30.01 (C-49, C-50), 25.95 (C-51), 12.91 (C-1).

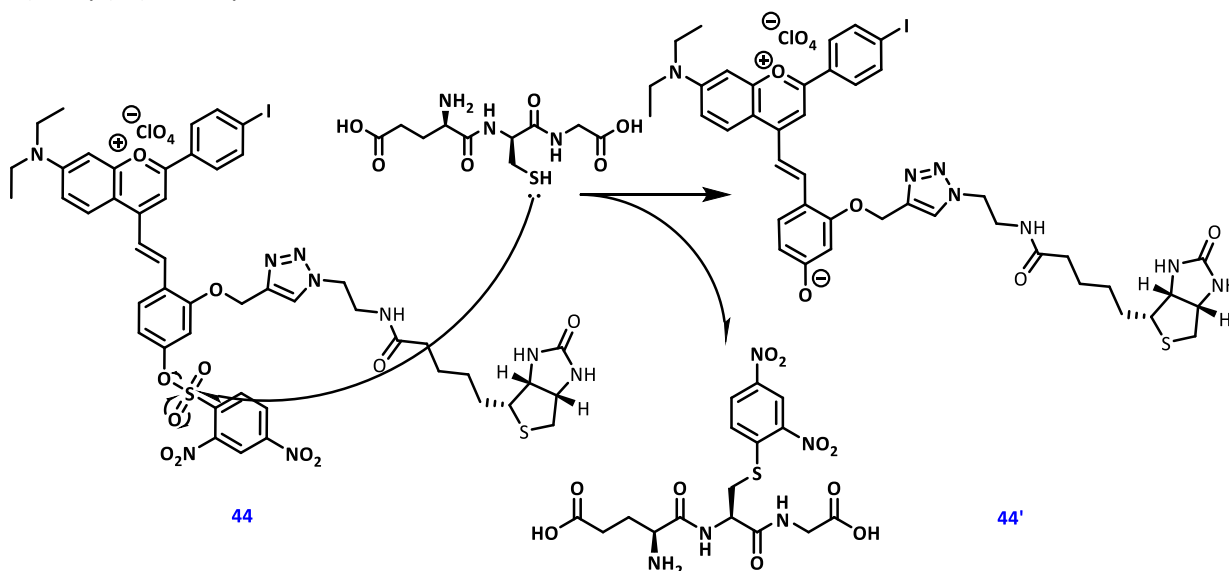


Εικόνα 145: Φάσμα μάζας υψηλής ανάλυσης της ένωσης 44. Το m/z 1118.20 αντιστοιχεί στο $[\text{M}+\text{H}]^+$ και το m/z 1134.19 αντιστοιχεί στο $[\text{M}+\text{H}]^+$ του οξειδωμένου αναλόγου.

Από το φάσμα μάζης αναμέναμε ένα θραύσμα σε m/z 1118,2032. Λάβαμε ένα θραύσμα σε m/z 1118,20172 που πιθανά αφορά το $[M^+]$. Επίσης λάβαμε ένα θραύσμα σε m/z 1134,19679 που πιθανά αφορά το $[M^+] +$ την μάζα ενός ισότοπου οξυγόνου.

2.4.2 Φασματοσκοπικές ιδιότητες και εκλεκτικότητα της ένωσης 44

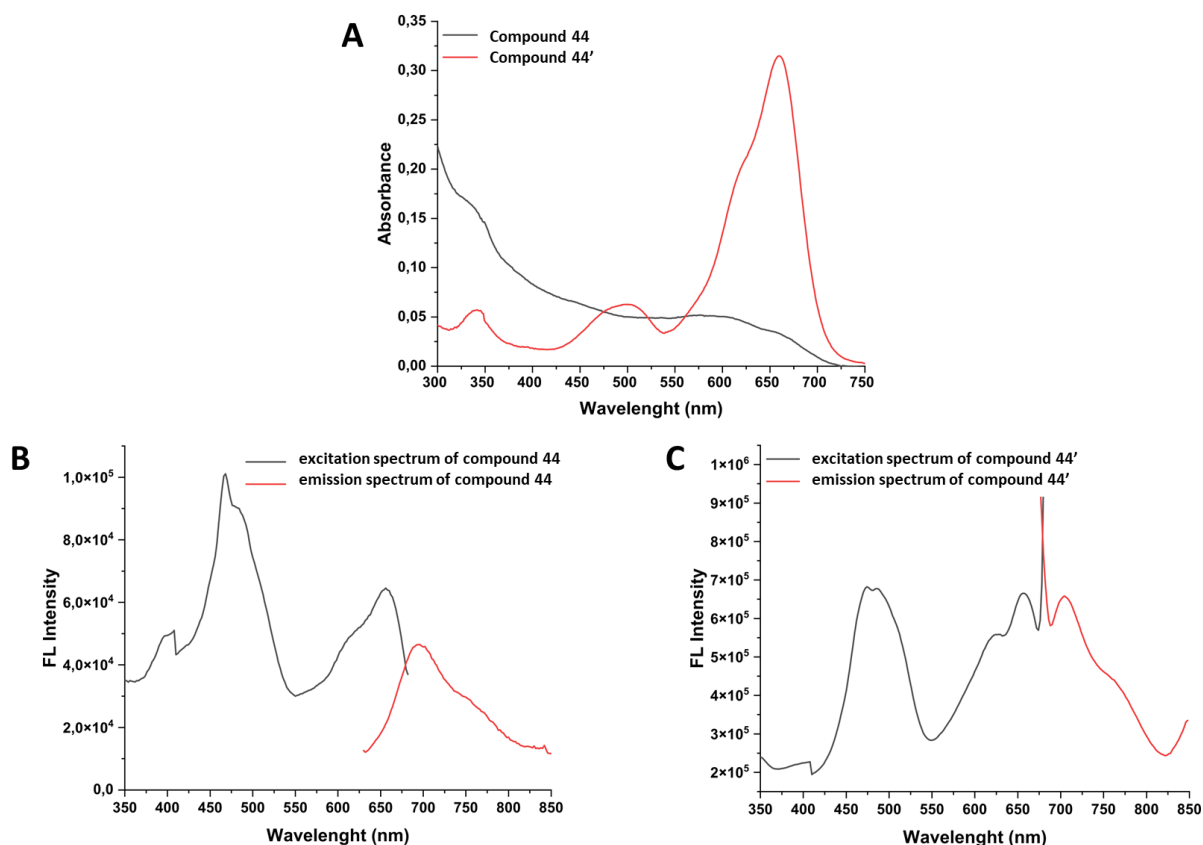
Όπως αναφέρθηκε και στην αρχή του κεφαλαίου αυτού η χρωστική **44** έχει ενσωματωμένο στην δομή της το 2,4-δινιτροβενζολοσουλφονυλοχλωριδίο, μια δραστική ομάδα που αφενός ανταποκρίνεται σε βιοθειόλες όπως η γλουταθειόνη και η κυστεΐνη και αφετέρου προκαλεί μεταβολή στον φθορισμό καθώς απομακρύνεται από την χρωστική. Ο μηχανισμός με τον οποίο λαμβάνει χώρα αυτή η διαδικασία φαίνεται στην **Εικόνα 146**. Η γλουταθειόνη αποτελεί την πιο άφθονη θειόλη στα κύτταρα. Διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στην οξειδοαναγωγικές διεργασίες των καρκινικών κυττάρων. Τα επίπεδα της GSH στα καρκινικά κύτταρα διαφοροποιούνται ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου, αλλά φαίνεται να σχετίζονται αντιστρόφως με την επιβίωση του ασθενούς [128]. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη μοριακών ανιχνευτών που ανταποκρίνονται σε πραγματικό χρόνο και υψηλή επιλεκτικότητα ως προς τις βιοθειόλες έχει μεγάλη σημασία στη διάγνωση και την κλινική αξιολόγηση του καρκίνου.



Εικόνα 146: Προτεινόμενος μηχανισμός διάσπασης του 2,4 δινιτροβενζολοσουλφονυλινού εστέρα της ένωσης **44** από τη γλουταθειόνη.

Προκειμένου να αξιολογήσουμε τις φασματοσκοπικές ιδιότητες της ένωσης **44**, πραγματοποιήθηκαν πειράματα τόσο με φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους όσο και φασματοσκοπία φθορισμού. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα της ένωσης (10 μ M σε DMSO: PBS (10 mM, pH 7.40, 1:1 v/v), για να μελετήσουμε τις φασματοσκοπικές της ιδιότητες σε περιβάλλον που να προσομοιάζει εκείνο του πλάσματος του αίματος. Παρατηρούμε ότι εμφανίζει ένα διακριτό φάσμα απορρόφησης με το $\lambda_{\max}$ να εστιάζεται στα 600 nm. Επίσης μελετήθηκαν τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής με λ_{exc} 656 nm και λ_{em} 694 nm. Τέλος υπολογίστηκε η μετατόπιση Stokes ίση με 38 nm. Επίσης συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα της ένωσης **44'** στις ίδιες συνθήκες όπου παρατηρήθηκαν ένα διακριτό φάσμα απορρόφησης με το $\lambda_{\max}$ να εστιάζεται στα 660 nm. Επίσης μελετήθηκαν τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής με λ_{exc} 656 nm και λ_{em} 702 nm. Τέλος, υπολογίστηκε η μετατόπιση Stokes ίση με 46 nm.

Μπορούμε λοιπόν να συμπεράνουμε ότι όταν η ένωση **44** αλληλοεπιδρά με βιοθειόλες και μεταβάλλεται η δομή της. Παρατηρείται μία μετατόπιση του φάσματος προς το κόκκινο. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί καθώς απομακρύνεται ένας ισχυρός δέκτης ηλεκτρονίων.

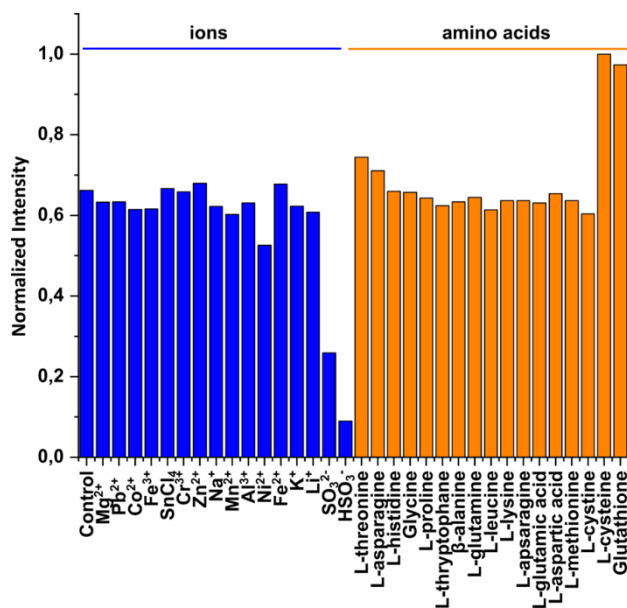


Εικόνα 147: Φάσματα Α) Απορρόφησης και Β), C) Φθορισμού των ενώσεων 44 & 44' (10 μ M) δειγμάτων σε DMSO: PBS (10 mM, pH 7.4, 3:7 v/v) σε θερμοκρασία 37 °C και step 2, ExBw: 10, EmBw: 10 για την 44 και , ExBw: 20, EmBw: 20 για την 44'.

Πίνακας 9: Μήκη κύματος απορρόφησης, διέγερσης, εκπομπής και μετατόπιση Stoke των ενώσεων 44 και 44'.

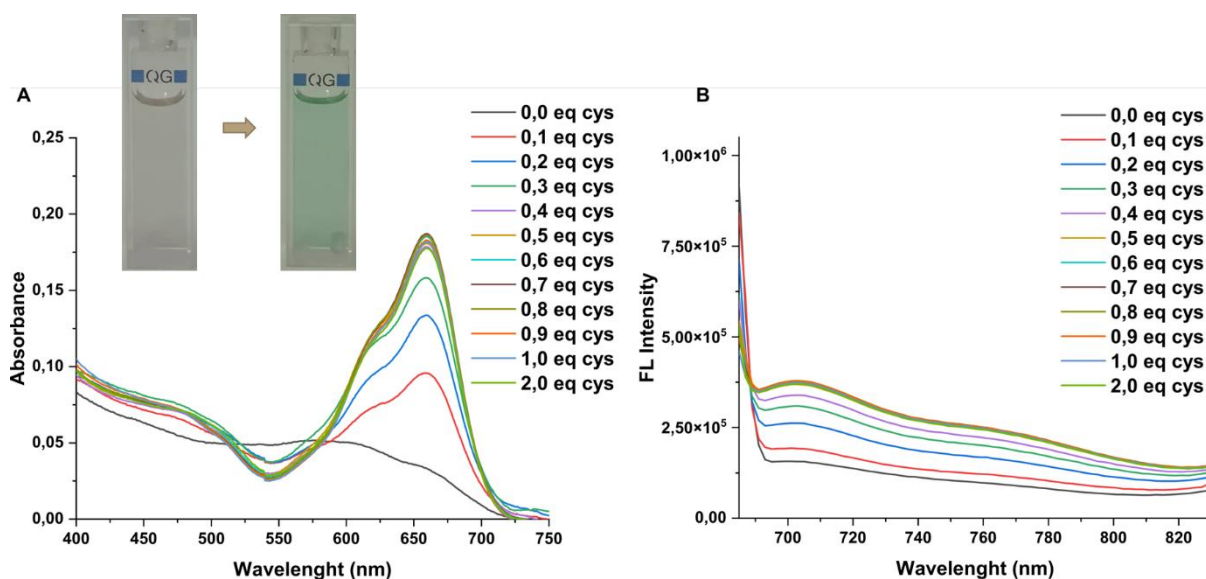
	λ_{abs} (nm)	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emission}}$ (nm)	Stokes shift (nm)
Compound 44	600	656	694	38
Compound 44'	660	656	702	46

Αρχικά ελέγχθηκε η εκλεκτικότητα της ένωσης **44** όσον αφορά την ανίχνευση βιοθειολών. Πραγματοποιήθηκαν ανταγωνιστικά πειράματα με φασματοσκοπία φθορισμού παρουσία διαφορετικών αναλυτών (ιόντων και αμινοξέων). Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 148**, φαίνεται, πως πέραν των βιοθειολών, δεν σημειώθηκαν μεγάλες μεταβολές στην ένταση φθορισμού της ένωσης μετά την προσθήκη άλλων αναλυτών. Πιο συγκεκριμένα, μετά από επώαση για 10 λεπτά με κυστεΐνη και γλουταθειόνη, παρατηρήθηκε μια διακριτή οκταπλάσια και επταπλάσια αντίστοιχα ενίσχυση του σήματος φθορισμού στα 602 nm. Επίσης, υπήρξε ορατή μεταβολή στο χρώμα του διαλύματος από ροζ σε πράσινο.



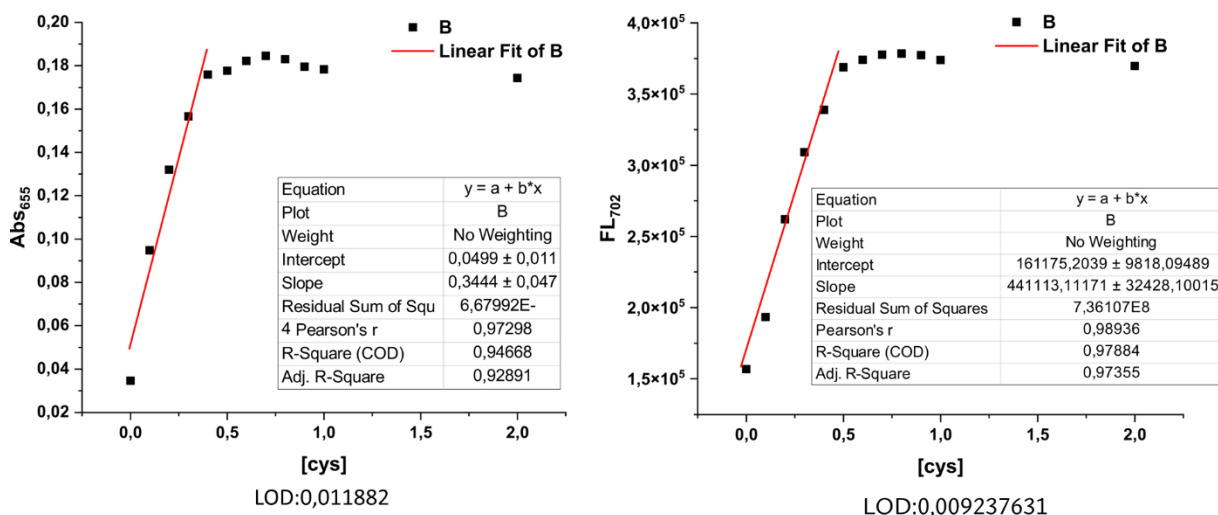
Εικόνα 148: Απόκριση του σήματος φθορισμού (I/I_0 στα 702 nm) της ένωσης **44** (10 μ M) έναντι διαφόρων αναλυτών (100 μ M), με PBS buffer (Phosphate-Buffered Saline, 10 mM, pH 7.4) σε θερμοκρασία 25 °C και step 2, ExBw: 20, EmBw: 20.

Προκειμένου λοιπόν, να παρακολουθήσουμε την απόκριση της ένωσης **44** έναντι αρχικά της κυστεΐνης πραγματοποιήθηκαν πειράματα τιτλοδότησης μέσω φασματοσκοπίας ορατού υπεριώδους και φθορισμού. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 149 A** η ένωση **44** σε PBS (10 mM pH 7.4) κατόπιν σταδιακής προσθήκης κυστεΐνης από διαλύματα συγκέντρωσης 100 μ M (έως 2.0 eq) παρατηρήθηκε μια διακριτή αύξηση της απορρόφησης συνοδευόμενη με βαθοχρωμική μετατόπιση από τα 600 στα 660 nm. Στη συνέχεια, αξιολογήσαμε την απόκριση της ένωσης **44** μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού κατόπιν διέγερσης στα 660 nm και με σταδιακής προσθήκη κυστεΐνης από διαλύματα συγκέντρωσης 100 μ M (έως 2.0 eq). Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 149 B** καταγράφηκε μια αύξηση του φάσματος φθορισμού στα 702 nm ~2.4 φορές.



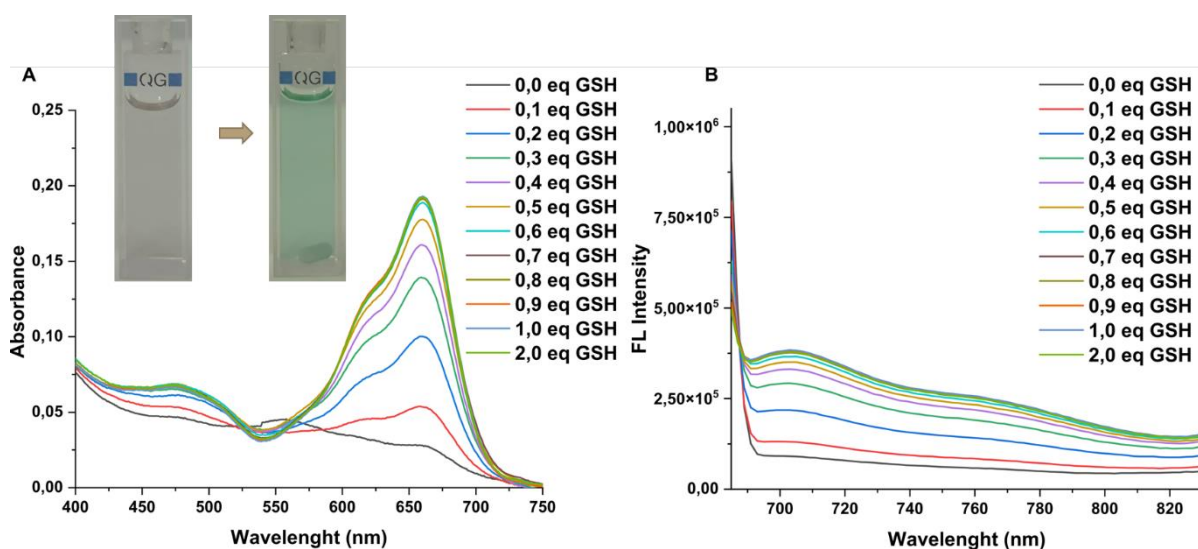
Εικόνα 149: Φασματοσκοπικές ιδιότητες της ένωσης **44** (10 μ M) σε DMSO: PBS (10 mM, pH = 7.40, 1: 1 v/v). (A), απορρόφησης (B), φθορισμού της ένωσης **44** κατόπιν διέγερσης στα 660 nm, παρουσία διαφορετικών ισοδυνάμων κ κυστεΐνης, σε θερμοκρασία 25°C, με step 2, ExBw: 20, EmBw: 20.

Επίσης παρουσιάζουν εξαιρετική γραμμικότητα (0.95 και 0.98 αντίστοιχα). Το όριο ανίχνευσης της ένωσης **44** υπολογίστηκε ίσο με 0.011882 mM με φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους και 0.0092376 mM με φθορισμό υποδεικνύοντας ότι η ένωση διαθέτει υψηλή ευαισθησία στην υπερέκφραση κυστεΐνης.



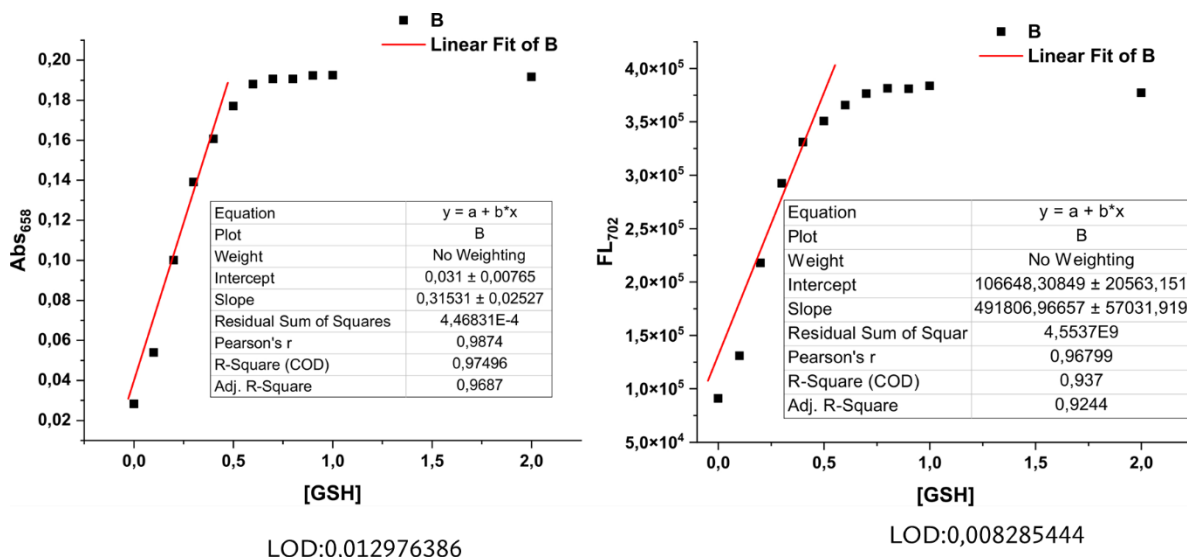
Εικόνα 150: Α) Απόκριση του σήματος απορρόφησης A_{655} συναρτήσει της συγκέντρωσης γλουταθειόνης. Β) Απόκριση σήματος φθορισμού FL_{702} συναρτήσει της συγκέντρωσης κυστεΐνης.

Προκειμένου τώρα, να παρακολουθήσουμε την απόκριση της ένωσης **44** έναντι της γλουταθειόνης πραγματοποιήθηκαν όμοια πειράματα τιτλοδότησης μέσω φασματοσκοπίας ορατού υπεριώδους και φθορισμού. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 151 Α** η ένωση **44** σε PBS (10 mM pH 7.4) κατόπιν σταδιακής προσθήκης κυστεΐνης από διαλύματα συγκέντρωσης 100 μ M (εώς 2.0 eq) παρατηρήθηκε μια διακριτή αύξηση της απορρόφησης συνοδευόμενη με βαθοχρωμική μετατόπιση από τα 600 στα 660 nm. Στη συνέχεια, αξιολογήσαμε την απόκριση της ένωσης **44** μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού κατόπιν διέγερσης στα 660 nm και με σταδιακή προσθήκη γλουταθειόνης από διαλύματα συγκέντρωσης 100 μ M (εώς 2.0 eq). Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 151 Β** καταγράφηκε μια αύξηση του φάσματος φθορισμού στα 702 nm ~4 φορές.



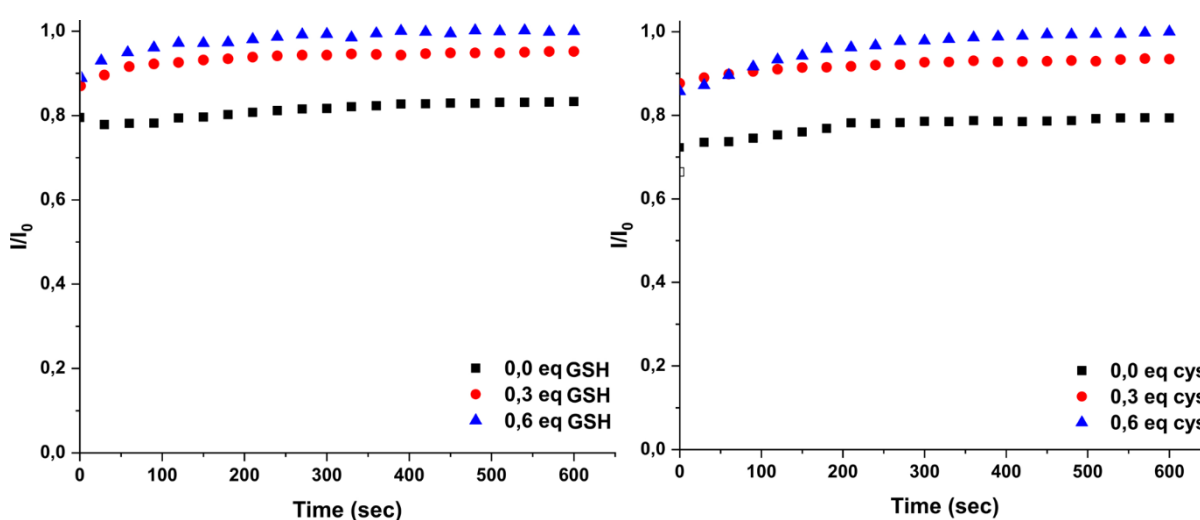
Εικόνα 151: Φασματοσκοπικές ιδιότητες της ένωσης **44** (10 μ M) σε DMSO: PBS (10 mM, pH = 7.40, 1: 1 v/v). (A), απορρόφησης (B), φθορισμού της ένωσης **44** κατόπιν διέγερσης στα 660 nm, παρουσία διαφορετικών ισοδυνάμων κ GSH, σε θερμοκρασία 25°C, με step 2, ExBw: 20, EmBw: 20.

Επίσης, παρουσιάζουν εξαιρετική γραμμικότητα (0.97 και 0.94 αντίστοιχα). Το όριο ανίχνευσης της ένωσης **44** υπολογίστηκε ίσο με 0.012976 mM με φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους και 0.00828544 mM με φθορισμό υποδεικνύοντας ότι η ένωση διαθέτει υψηλή ευαισθησία στην υπερέκφραση γλουταθειόνης.



Εικόνα 152: A) Απόκριση του σήματος απορρόφησης A₆₅₈ συναρτήσει της συγκέντρωσης γλουταθειόνης. B) Απόκριση σήματος φθορισμού FL₇₀₂ συναρτήσει της συγκέντρωσης γλουταθειόνης.

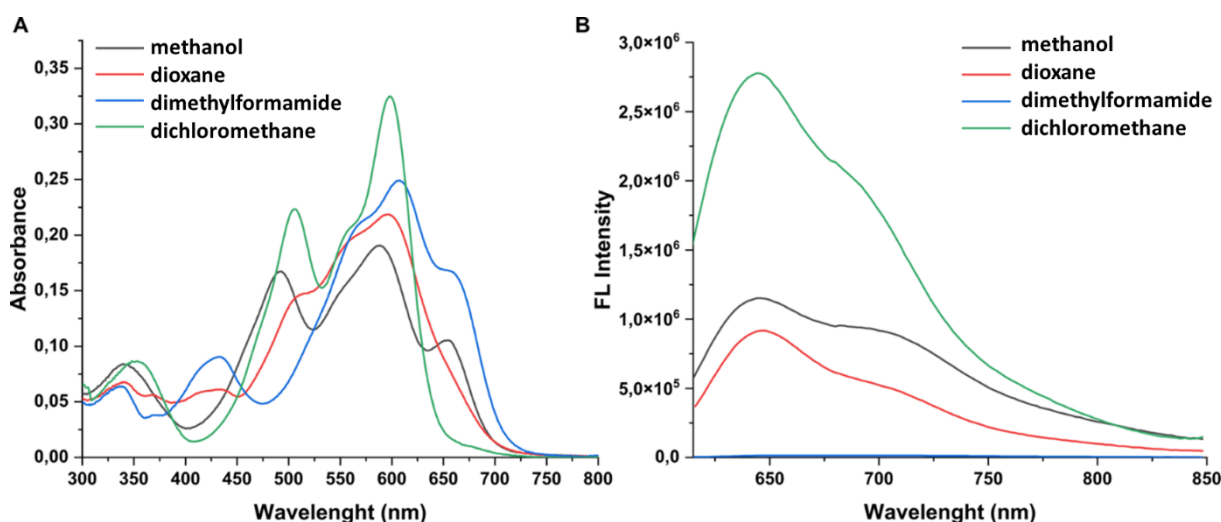
Προκειμένου να αξιολογήσουμε τον ρυθμό απόκρισης της ένωσης **44** παρουσία τόσο κυστεΐνης όσο και γλουταθειόνης πραγματοποιήθηκαν πειράματα κινητικής παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναλύτη (0.0, 0.3 και 0.6 ισοδυνάμων), με φασματοσκοπία φθορισμού.



Εικόνα 153: Κινητική μελέτη της ένωσης **44** (10 μ M in DMSO: PBS 10 mM, pH 7.40, 1:1) κατόπιν διέγερσης στα 580 nm απουσία και παρουσία (A) 0.3 και 0.6 ισοδυνάμων γλουταθειόνης (B) 0.3 και 0.6 ισοδυνάμων κυστεΐνης σε θερμοκρασία 25 °C .

Παρατηρούμε ότι η ένωση **44** παρουσιάζει μεταβολή των φωτοφυσικών ιδιοτήτων της κυρίως στην απορρόφηση ενώ η μεταβολή του φθορισμού δεν είναι τόσο έντονη. Αξιοσημείωτη είναι η μεταβολή στο χρώμα του διαλύματος της ένωσης επομένως μπορεί να χαρακτηριστεί ως χρωματομετρικό μόριο.

Στη συνέχεια μελετήσαμε τις φασματοσκοπικές ιδιότητες της ένωσης **44'**, της ένωσης δηλαδή που προκύπτει μετά την αλληλεπίδραση με βιοθειόλες. Σε ένα πρώτο βήμα πραγματοποιήθηκαν πειράματα της ένωσης **44'** (10 μ M) σε διαλύτες με διαφορά στην πολικότητα και την ικανότητα τους να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου (σε μη πολικό διαλύτη, σε πολικό απρωτικό διαλύτη και σε πολικό πρωτικό διαλύτη). Η χρωστική αυτή διαθέτει δομή ώθησης-έλξης η οποία διασφαλίζει ότι μετά την απορρόφηση φωτός το φορτίο μεταφέρεται από την ομάδα δότη στον δέκτη, γεγονός που δημιουργεί μια εξαιρετικά διπολική κατάσταση διεγέρσεως όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Εδώ παρατηρούμε ότι η κορυφή με την υψηλότερη ένταση είναι εκείνη της ένωσης σε CH_2Cl_2 . Δεν παρατηρούμε κάποια χαρακτηριστική μετατόπιση στο κόκκινο όσο αυξάνεται η πολικότητα του διαλύτη. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι η ένωση δεν λειτουργεί μέσω του φαινομένου TICT.



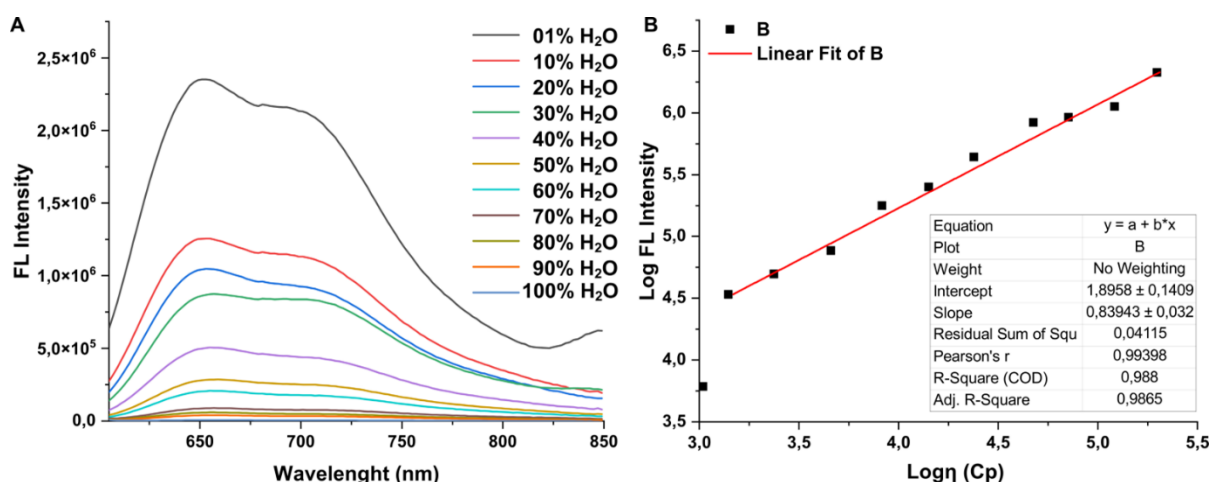
Εικόνα 154: Φάσματα Α) Απορρόφησης και Β) Φθορισμού της ένωσης της ένωσης **44'** (10 μ M) του δείγματος σε μη πολικό διαλύτη, σε πολικό απρωτικό διαλύτη και σε πολικό πρωτικό διαλύτη. Το σχήμα περιγράφει τα φάσματα του ανιχνευτή παρουσία φαινομένων διαλυτοποίησης κατόπιν διέγερσης στα 590 nm σε θερμοκρασία 25°C, με step 2, ExBw: 5, EmBw: 5.

Πίνακας 10: Μήκη κύματος απορρόφησης και εκπομπής της ένωσης **44'** συναρτήσει του διαλύτη.

Διαλύτης	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)
Διοξάνιο (dioxane) Μη πολικός διαλύτης	597	645
Διμεθυλφορμαμίδιο (dimethylformamide) Πολικός απρωτικός διαλύτης	606	645
Διχλωρομεθάνιο (dichloromethane) Πολικός απρωτικός διαλύτης	600	645
Μεθανόλη (methanol) Πολικός πρωτικός διαλύτης	589	645

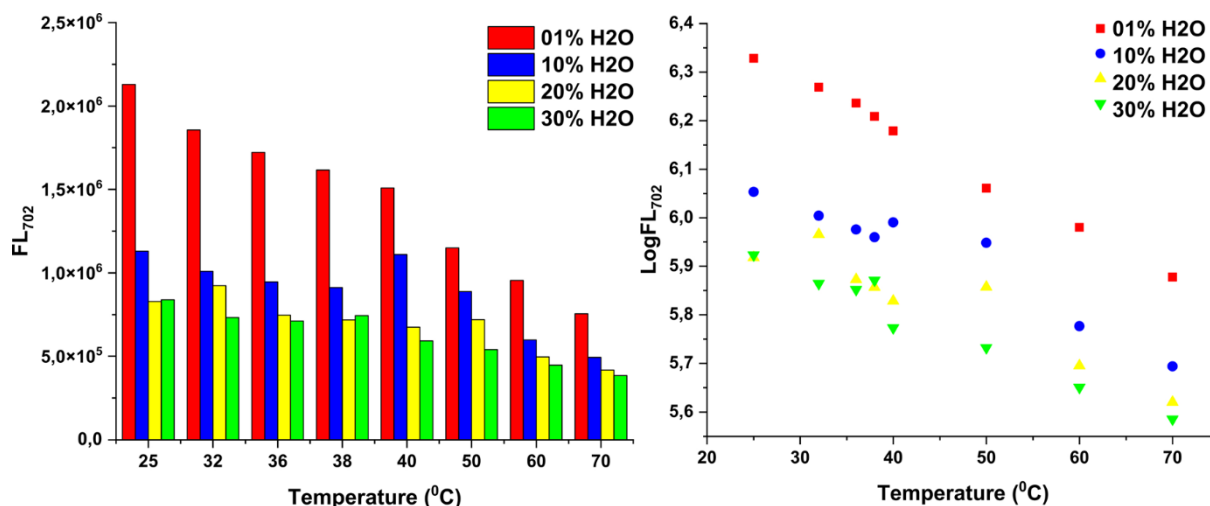
Για να αξιολογήσουμε την ανταπόκριση της ένωσης **44'** στη μεταβολή του ιζώδους πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού χρησιμοποιώντας διαφορετικά δυαδικά μίγματα γλυκερόλης/νερού (από 0% έως 99%) αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 155 A**, η ένωση **44'** σε αυτά τα υδατικά μέσα εμφανίζει ένα ασθενές σήμα φθορισμού, ενώ με σταδιακή αύξηση του ποσοστού γλυκερόλης, παρατηρήθηκε ότι το σήμα φθορισμού αυξήθηκε σημαντικά (~ **315 φορές στα 650nm**). Η μεταβολή φαίνεται να είναι εντονότερη καθώς μειώνεται το ποσοστό νερού 10 - 1%. Επομένως και αυτή θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως μοριακός ρότορας.

Επιπλέον, η ένταση του φθορισμού εμφάνισε εξαιρετική γραμμικότητα ($R^2 = 0.988$) στη μεταβολή του διαλύτη από νερό (logη -0.05 cP) σε γλυκερόλη (99%, logη 2.88 cP). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ένωση **44'** είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στη μεταβολή του ιζώδους και θα μπορούσαν ενδεχομένως τόσο αυτή όσο και η **44** να χρησιμοποιηθούν σαν ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο ώστε να προσδιορίσει τη μεταβολή του ιζώδους σε ένα κυτταρικό μικροπεριβάλλον.



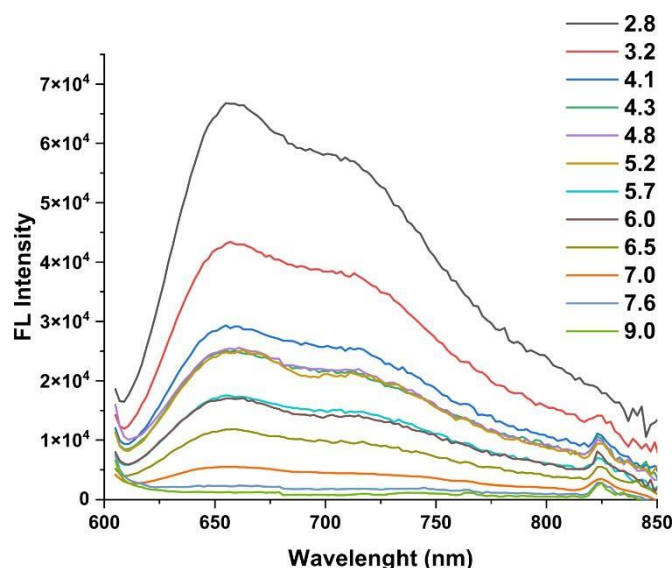
Εικόνα 155: A) Φάσματα φθορισμού της ένωσης της ένωσης **44'** (10 μM) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού (από 0% έως 99% γλυκερόλη) κατόπιν διέγερσης στα 590 nm. B) Συσχετισμός του λογάριθμου της έντασης φθορισμού στα 702 nm με τον λογάριθμο του ιζώδους (η) στο ίδιο σύστημα γλυκερόλης/νερού. κατόπιν διέγερσης στα 590 nm σε θερμοκρασία 25°C, με step 2, ExBw: 5, EmBw: 5.

Στη συνέχεια, δεδομένου πως το ιζώδες επηρεάζεται σημαντικά από τη μεταβολή της θερμοκρασίας πραγματοποιήθηκαν συμπληρωματικές μελέτες σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 156 A**, η διαφορά της έντασης του σήματος φθορισμού της ένωσης **44'** στα διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού διατηρείται σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις παρά το γεγονός ότι η θερμοκρασία αυξάνεται σημαντικά από 25 °C σε 70 °C. Επιπλέον, όπως απεικονίζεται και στην **Εικόνα 156 B** η μεταβολή του λογαρίθμου της έντασης του φθορισμού εμφανίζεται μεγάλη γραμμικότητα ανεξάρτητα του δυαδικού συστήματος γλυκερόλης/νερού. Τα αποτελέσματα αυτά επίσης συνάδουν με την υπόθεση μας ότι ανταποκρίνεται στο ιζώδες αποκλείοντας την παράμετρο της διαλυτότητας.



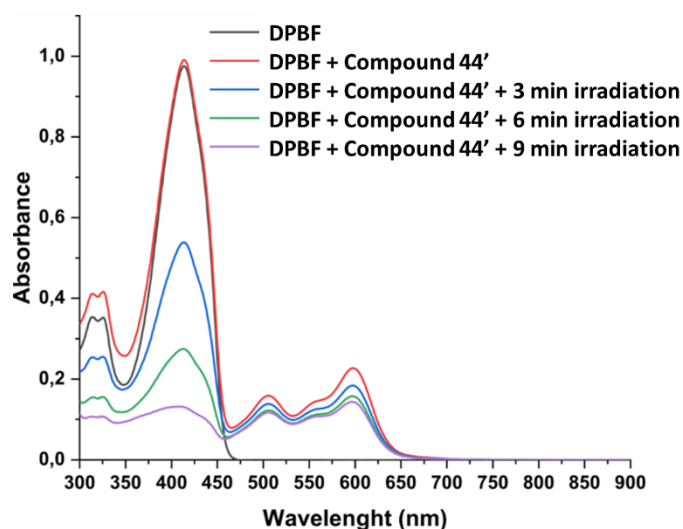
Εικόνα 156: Α) Συσχέτιση της μεταβολής της έντασης του φθορισμού FL₇₀₂ της ένωσης 44' (10 μ M) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού με τη θερμοκρασία Β) Συσχέτιση του λογαρίθμου έντασης του φθορισμού FL₇₀₂ (10 μ M) της ένωσης 44' και της θερμοκρασίας στα διαφορετικά συστήματα γλυκερόλης/νερού, με step 2, ExBw: 5, EmBw: 5.

Ακολούθησαν πειράματα σε διαφορετικά pH, για να μελετήσουμε την συμπεριφορά της ένωσης καθώς μεταφέρεται από pH 7.4 που χαρακτηρίζει το πλάσμα του αίματος σε pH 6.0 που χαρακτηρίζει το εξωκυττάριο περιβάλλον των καρκινικών κυττάρων. Προκειμένου να λάβουν χώρα τα πειράματα προετοιμάστηκαν διαλύματα από Citrate Buffer διαφορετικού pH [Stocks solutions: A) 0.1 M solution of citric acid, B) 0.1 M solution of sodium citrate] [123]. Από τα αποτελέσματα παρατηρούμε αύξηση της έντασης φθορισμού περίπου 53 φορές, στο μήκη κύματος διέγερσης 590 nm, όσο μειώνεται το pH. Δηλαδή η ένταση θα παρουσιάζει εντονότερο φθορισμό σε καρκινικό μικροπεριβάλλον. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην πρωτονίωση της διαιθυλάμινο- ομάδας του χρωμοφόρου πυρήνα, που σημαίνει αλλαγή της φύσης του ενός δότη της χρωστικής, όπως δηλαδή και στην προηγούμενη χρωστική.



Εικόνα 157: Φάσματα φθορισμού της ένωσης της ένωσης 44' (10 μ M) σε διαφορετικά pH (από 2.6 έως 7.9) κατόπιν διέγερσης στα 590 nm, σε θερμοκρασία 25°C., με step 2, ExBw: 5, EmBw: 5. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί buffer phosphate-citrate.

Τέλος, θελήσαμε να εξετάσουμε την εν δυνάμει κυτταροτοξικότητα του μορίου μετά από ακτινοβολήση, μέσω φασματοσκοπίας ορατού υπεριώδους σε διάλυμα της ένωσης σε CH_2Cl_2 . Το πείραμα αυτό είχε κυρίως ποιοτικό σκοπό. Πιο συγκεκριμένα, αρχικά λήφθηκε ένα φάσμα του DPBF σε CH_2Cl_2 με συγκέντρωση τέτοια ώστε η απορρόφηση του να είναι ~1 (0.05 mM). Στη συνέχεια στο ίδιο διάλυμα προστέθηκε η ένωση **44'** ώστε η απορρόφηση της να είναι ~0.2 και ακολούθησε καταγραφή του φάσματος του μίγματος των δύο ενώσεων. Τέλος, το μίγμα αυτό ακτινοβολήθηκε υπό ανάδευση για διάφορα χρονικά διάστημα, ενώ ενδιάμεσα καταγράφονταν τα φάσματα απορρόφησης. Παρατηρούμε ότι για το χρονικό διάστημα από 0 έως 9 λεπτά ακτινοβολήσης η ένταση της κορυφής του DPBF μειώνεται ραγδαία γεγονός που σημαίνει ότι παράγονται δραστικές ρίζες μονήρους οξυγόνου. Από την άλλη η ένταση της ένωσης φαίνεται να επηρεάζεται από την ακτινοβολήση επομένως θα λέγαμε ότι δεν είναι φωτοσταθερή (photobleaching).



Εικόνα 158: Απόκριση του σήματος απορρόφησης της ένωσης **44** (10 μM) και του μίγματος της ένωσης **44** και του DPBF έναντι διαφορετικών χρόνων ακτινοβολήσης.

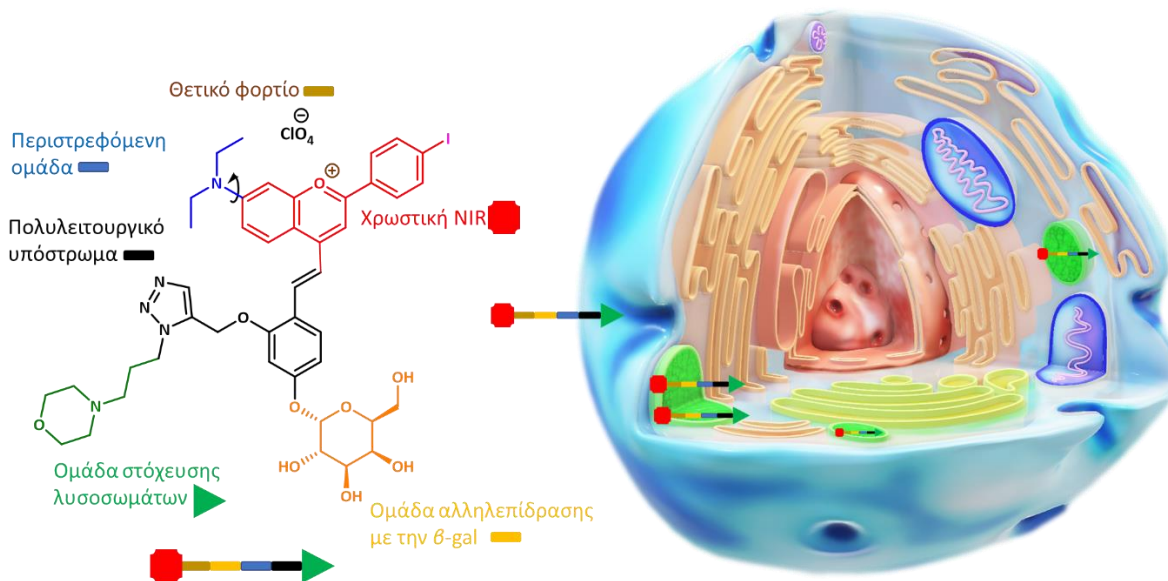
Επομένως, συνθέσαμε μια ένωση που ανταποκρίνεται στο ιξώδες όμοια με τις προηγούμενες με το επιπλέον χαρακτηριστικό ότι αλληλοεπιδρά ειδικά με βιοθειόλες οδηγώντας σε χρωματική αλλαγή εμφανή με γυμνό οφθαλμό. Και αυτή φαίνεται να αποτελεί εξαιρετικό θεραπευγνωστικό εργαλείο, αφού έδωσε εξαιρετικά φωτοφυσικά χαρακτηριστικά και εν δυνάμει πολύ καλή κυτταροτοξικότητα επαγόμενη από ακτινοβολήση.

2.5 Σχεδιασμός, σύνθεση και αξιολόγηση θεραπευγνωστικής ένωσης που εισέρχεται στα λυσοσώματα των γηρασμένων κυττάρων και ανταποκρίνεται στην β -γαλακτοσιδάση, αυξάνοντας την ένταση φθορισμού της

Τα υποκυτταρικά οργάνδια που στοχεύονται αυτή την φορά είναι τα λυσοσώματα. Όντας τα κύρια πεπτικά διαμερίσματα των κυττάρων, αποθηκεύουν πολυάριθμα ένζυμα για την αποικοδόμηση και την ανακύκλωση διαφορετικών εξωγενών και ενδογενών βιομορίων και μπορούν να προστατεύσουν αποτελεσματικά τα κύτταρα από μόλυνση, ασιτία και στρες. Οι υδrolάσες αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα ενζύμων που εδρεύουν κυρίως στα λυσοσώματα. Ένα άλλο χαρακτηριστικό των λυσοσωμάτων είναι ότι χαρακτηρίζονται από χαμηλό pH (4.5-6.0) και διαθέτουν δομή απλής στοιβάδας [129]. Προκειμένου να επιτευχθεί εκλεκτική στόχευση των λυσοσωμάτων χρησιμοποιούνται λιπόφιλες αμίνες αφού λόγω της εύκολης πρωτονίωσης που υφίστανται, λόγω του όξινου pH, δεν μπορούν να εξέλθουν από τη μεμβράνη, με αποτέλεσμα την παγίδευση τους εντός

των λυσοσωμάτων. Τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων αμινών αποτελούν τα ανάλογα της μορφολίνης και της N, N'-διμεθυλαιθυλενοδιαμίνης [130, 131].

Ακολουθώντας λοιπόν μια παρόμοια λογική χρησιμοποιήθηκε το πολυλειτουργικό υπόστρωμα **36**, προκειμένου να εκμεταλλευτούμε: i) την αλδεΐδη για μία συμπύκνωση ii) την τελική ομάδα αλκινίου, ώστε να στοχεύσουμε τα λυσοσώματα των γηρασμένων κυττάρων μέσω click χημείας καταλυόμενης από χαλκό (Huisgen Reaction) και iii) την υδροξυλική ομάδα που επιτρέπει πυρηνόφιλες αντιδράσεις με κάποια ομάδα που να ανταποκρίνεται ειδικά σε κάποιο ερέθισμα. Ακολούθησε σε ένα πρώτο βήμα η συμπύκνωση μεταξύ του χρωμοφόρου τμήματος, και του νέου πολυλειτουργικού υποστρώματος, ώστε να προκύψει η χρωστική ένωση **41**. Στη συνέχεια, προκειμένου οι διαγνωστικές ενώσεις να συσσωρεύονται ειδικά στα λυσοσώματα των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε κατάλληλη τροποποίηση στην εμπορικά διαθέσιμη ένωση μορφολίνη, ώστε να διαθέτει τελική ομάδα αζιδίου [132]. Ακολούθησε αντίδραση κυκλοπροσθήκης μεταξύ του αναλόγου της μορφολίνης που φέρει ομάδα αζιδίου και του τελικού αλκινίου της ένωσης **41** προκειμένου να συντεθεί η πρόδρομη ένωση **48**. Τέλος, το σύζευγμα αυτό συνδέθηκε μέσω της φαινολικής υδροξυλομάδας, και μιας αντίδρασης άκυλο υποκατάστασης, με το εμπορικά διαθέσιμο τετρα-O-ακετυλο-α-D-γαλακτοπυρανοσυλο-1-βρωμιδίου. Το σάκχαρο α-D-γαλακτοπιρανόζη που προκύπτει μετά από απομάκρυνση των προστατευτικών ακέτυλο ομάδων, ανταποκρίνεται ειδικά στην β-γαλακτοσιδάση (β-gal). Η β-gal είναι ένα ένζυμο, μια λυσοσωμική υδρολάση με βασικό ρόλο την διάσπαση των γαλακτοσιδικών δεσμών προς σχηματισμό των αντίστοιχων μονοσακχαριτών και με βέλτιστη ενζυματική δράση σε pH 4.0-4.5 [133]. Μετά την συσσώρευση του μορίου στα λυσοσώματα και την αλληλεπίδραση με την β-gal, προκύπτει μεταβολή του φθορισμού δηλαδή έναυσμα για την ακτινοβολή και θανάτωση των κυττάρων στόχων.

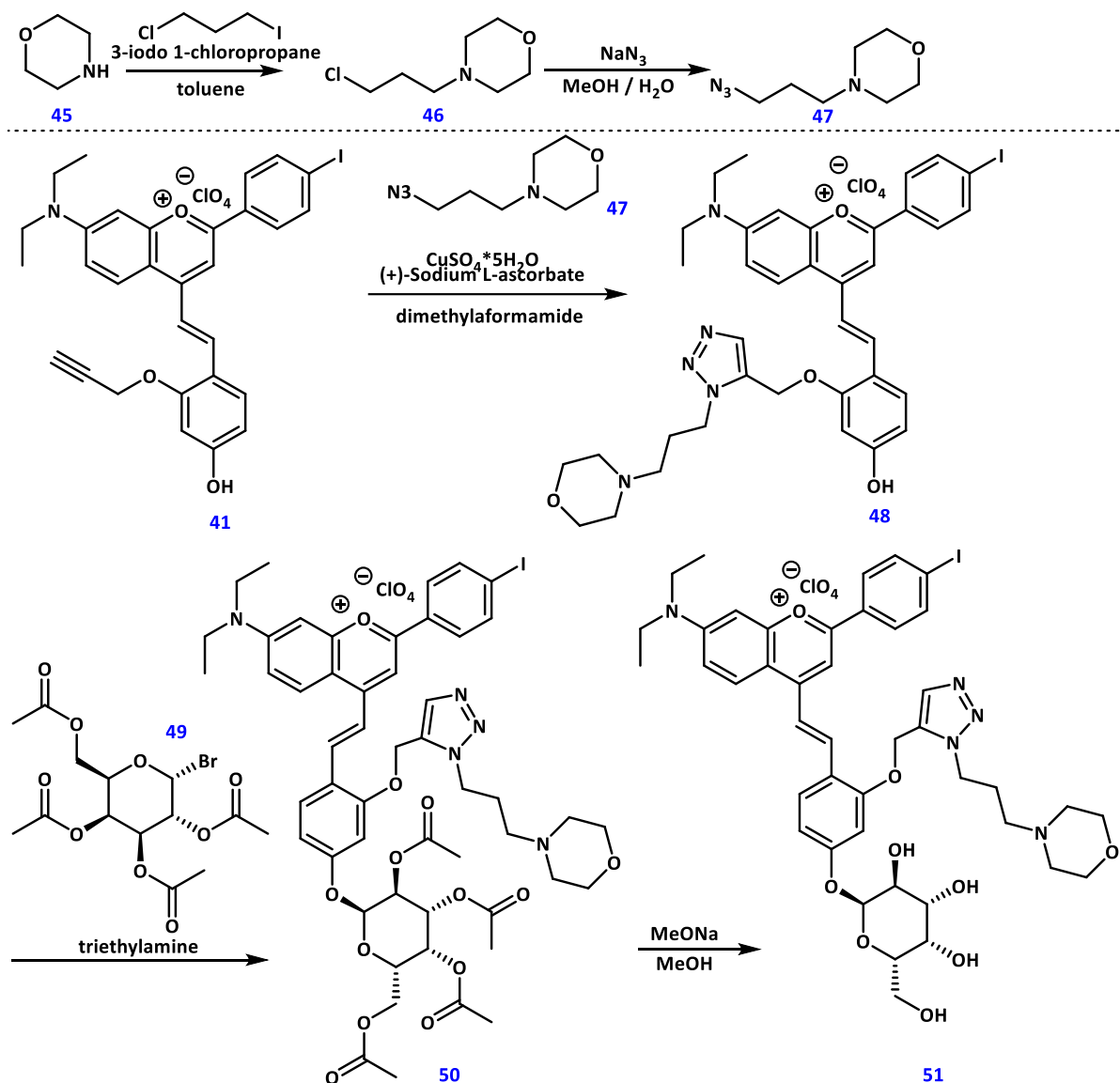


Εικόνα 159: Σχηματική αναπαράσταση των δομικών συστατικών και του προτεινόμενου τρόπου δράσης της διαγνωστικής ένωσης 51.

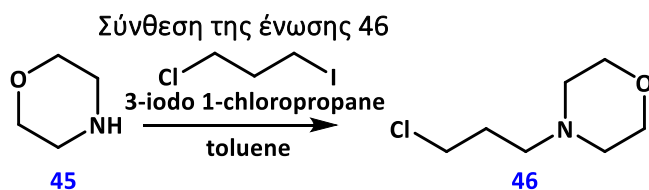
2.5.1 Συνθετική πορεία της διαγνωστικής ένωσης 51

Επομένως, συνθέσαμε μια θεραπευτική ένωση με χρωμοφόρο πυρήνα την νεοσυνθεθειμένη χρωστική, με μία ομάδα τροποποιημένης μορφολίνης που οδηγεί στην συσσώρευση των μορίων στα λυσοσώματα των κυττάρων. Στη συνέχεια, συνδέθηκε με ένα μόριο που ανταποκρίνεται στην β-gal που υπάρχει στα λυσοσώματα. Το προκύπτουν μόριο μετά την αλληλεπίδραση παρουσιάζει μεταβολή του φθορισμού σε μεταβολή του ιξώδους. Πιο συγκεκριμένα, η χρωστική διαθέτει:

1. φθοροφόρο σκελετό τύπου άλατος φλαβυλίου, που εκπέμπει στην περιοχή του εγγύς υπερύθρου και διαθέτει ιδιότητες φωτοευαισθητοποιητή,
2. ομάδα στόχευσης για τα λυσοσώματα,
3. και ομάδα ενεργοποίησης που ανταποκρίνεται στην SA-β-γαλακτοσιδάση (Senescence Associated β-Galactosidase).



Εικόνα 160: Πειραματική πορεία σύνθεσης της θεραπευτικής ένωσης 51

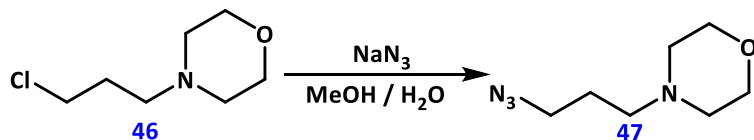


Εικόνα 161: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 46.

Σε διάλυμα μορφολίνης (110 μL , 1.26 mmol), σε τολουόλιο (2 mL), προστέθηκε 3-ιωδο 1-χλωρο προπάνιο (135 μL , 1.26 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης θερμάνθηκε με αναρροή για 4 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης προστέθηκε διάλυμα 5% υδροξειδίου του νατρίου και ακολούθησε

εκχύλιση με τολουόλιο (2*10 mL), όπου συλλέχθηκαν οι οργανικές φάσεις. Οι οργανικές φάσεις ξηράνθηκαν με Na₂SO₄, συμπυκνώθηκαν με εξάτμιση υπό υψηλό κενό ώστε να παραλάβουμε το επιθυμητό προϊόν σαν παχύρευστο κίτρινο λάδι (105 mg, 51%). Ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **46** μέσω φασματοσκοπίας NMR παρατίθεται στο παράρτημα του κειμένου.

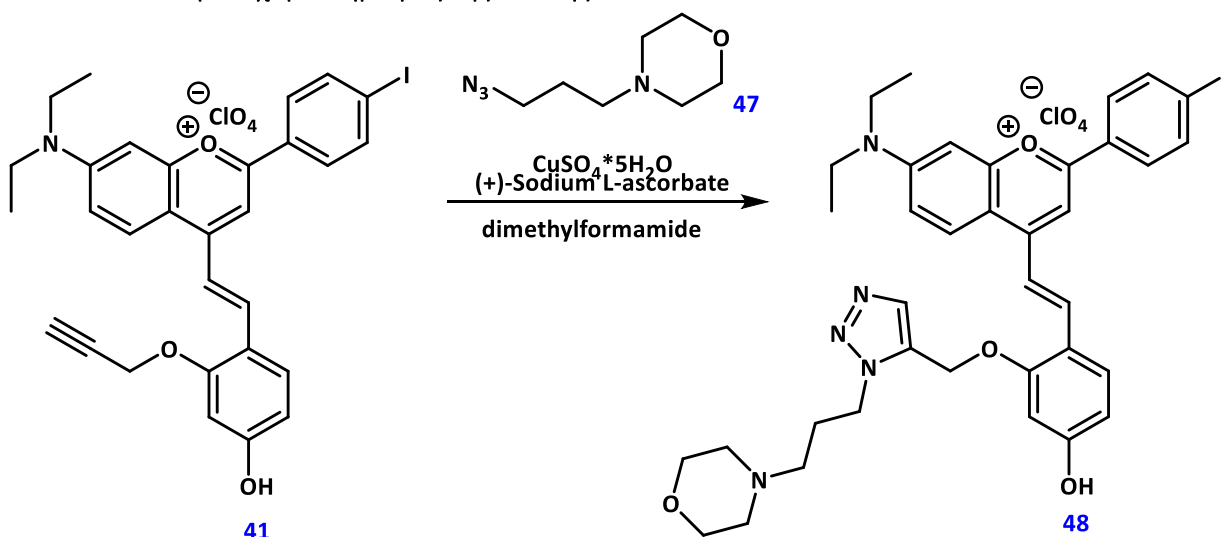
Σύνθεση της ένωσης 47



Εικόνα 162: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 47.

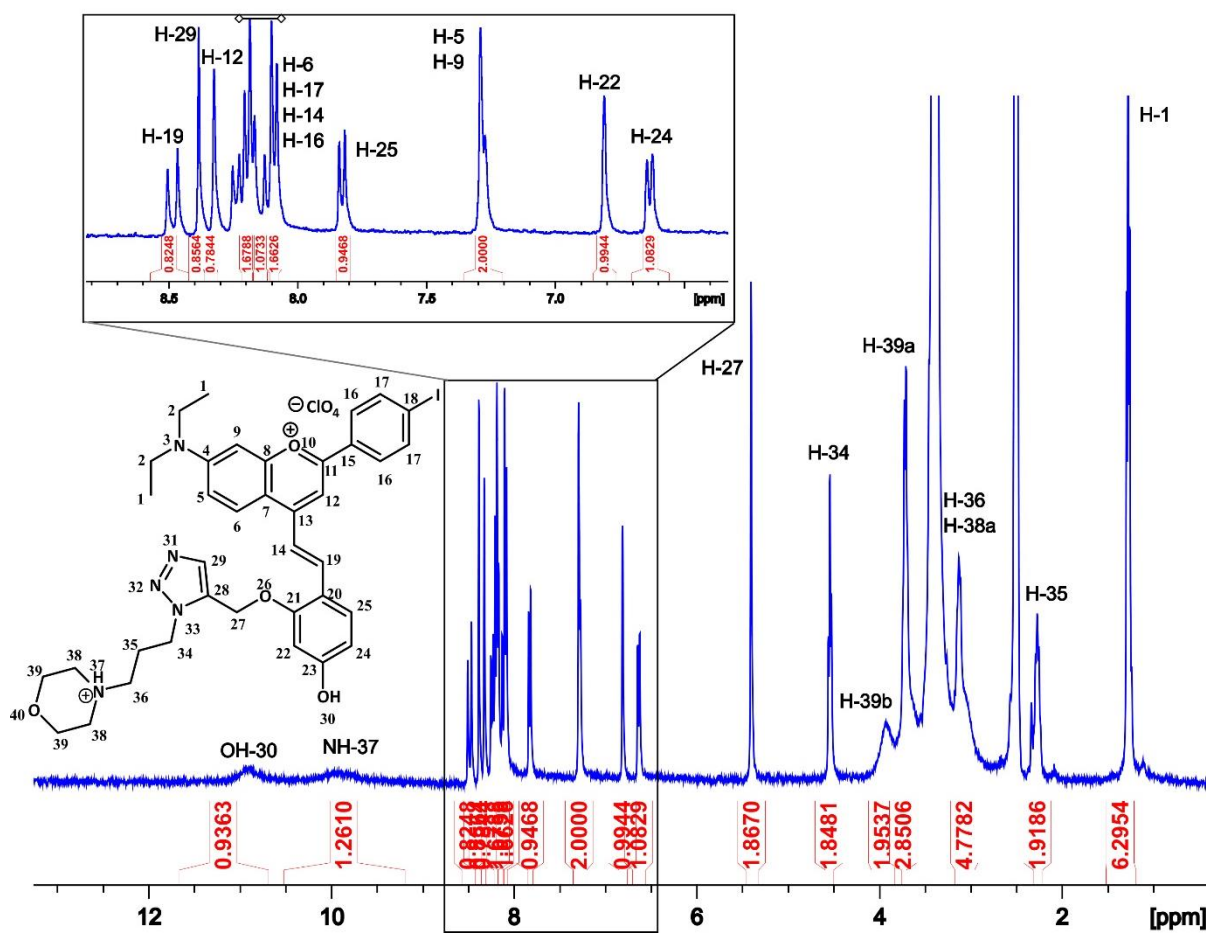
Σε διάλυμα της ένωσης **46** (70 mg, 0.428 mmol), σε μίγμα νερού/μεθανόλης (1:5, 1 mL / 5 mL), προστέθηκε νατραζίδιο (140 mg, 2.13 mmol) και το διάλυμα της αντίδρασης θερμάνθηκε με αναρροή για 16 ώρες. Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό υψηλό κενό. Στη συνέχεια, στο υπόλειμμα προστέθηκε νερό (20 mL) και ακολούθησε εκχύλιση με EtOAc (2*15 mL), όπου συλλέχθηκαν οι οργανικές φάσεις. Οι οργανικές φάσεις ξηράνθηκαν με Na₂SO₄, συμπυκνώθηκαν με εξάτμιση υπό υψηλό κενό ώστε να παραλάβουμε το επιθυμητό προϊόν σαν κίτρινο λάδι (65 mg, 90%). Ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **47** μέσω φασματοσκοπίας NMR παρατίθεται στο παράρτημα του κειμένου.

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 48



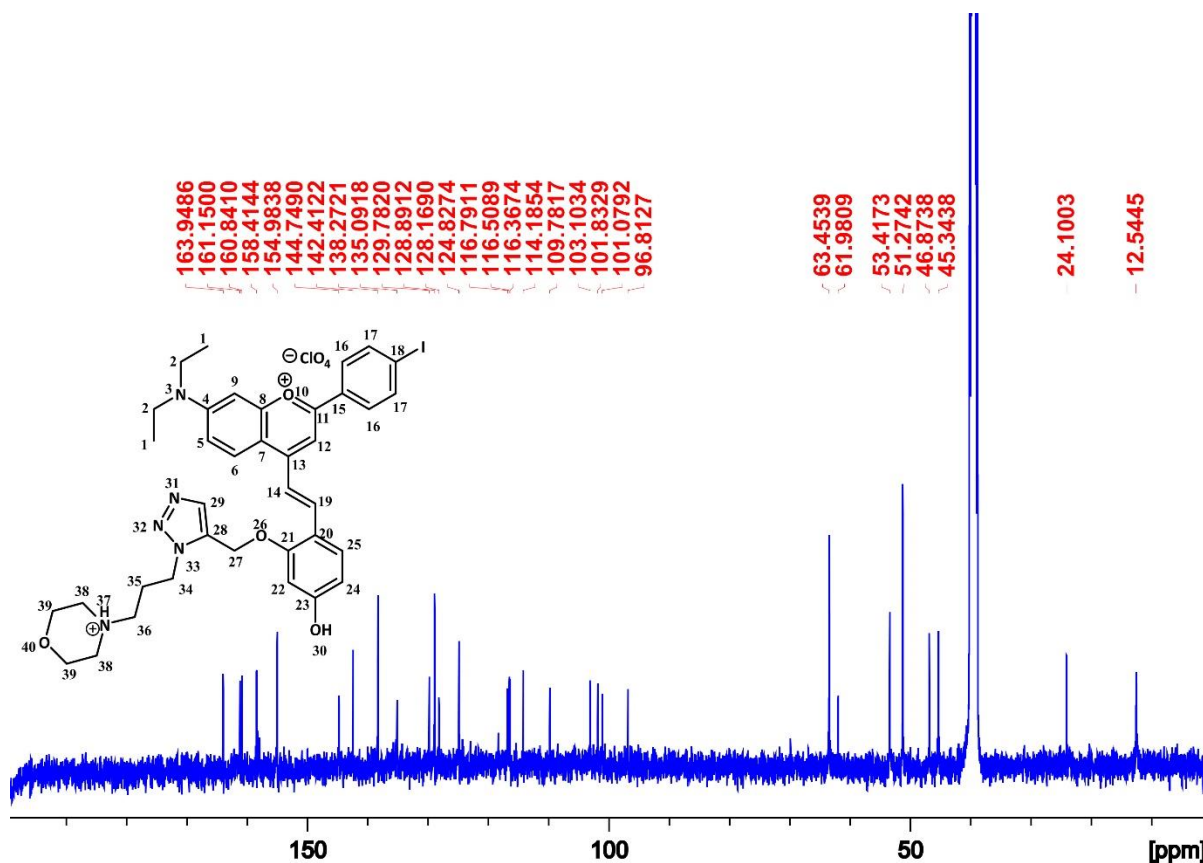
Εικόνα 163: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 48.

Σε διάλυμα της ένωσης **41** (67.7 mg, 0.13 mmol) σε N,N διμεθυλοφορμαμίδιο (5 mL) υπό έντονη ανάδευση, προστέθηκαν διαδοχικά το ασκορβικό νάτριο (5.2 mg, 0.026 mmol), ο πενταένυδρος θειϊκός χαλκός (2.44 mg, 0.098 mmol) και η ένωση **47** (44.5 mg, 0.26 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολούθηθηκε με TLC χρωματογραφία με σύστημα διαλυτών MeOH/CH₂Cl₂ (5% v/v). Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση ο διαλύτης της αντίδρασης απομακρύνθηκε υπό υψηλό κενό και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με HPLC χρωματογραφία (από 45:55 H₂O: ACN έως 0:100 H₂O: ACN, 550 nm) ώστε να λάβουμε το επιθυμητό προϊόν σαν μωβ στερεό (35.3 mg, 32%). Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **48** μέσω φασματοσκοπίας NMR.



Εικόνα 164: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 48 σε DMSO-d_6 (400 MHz, 25 °C).

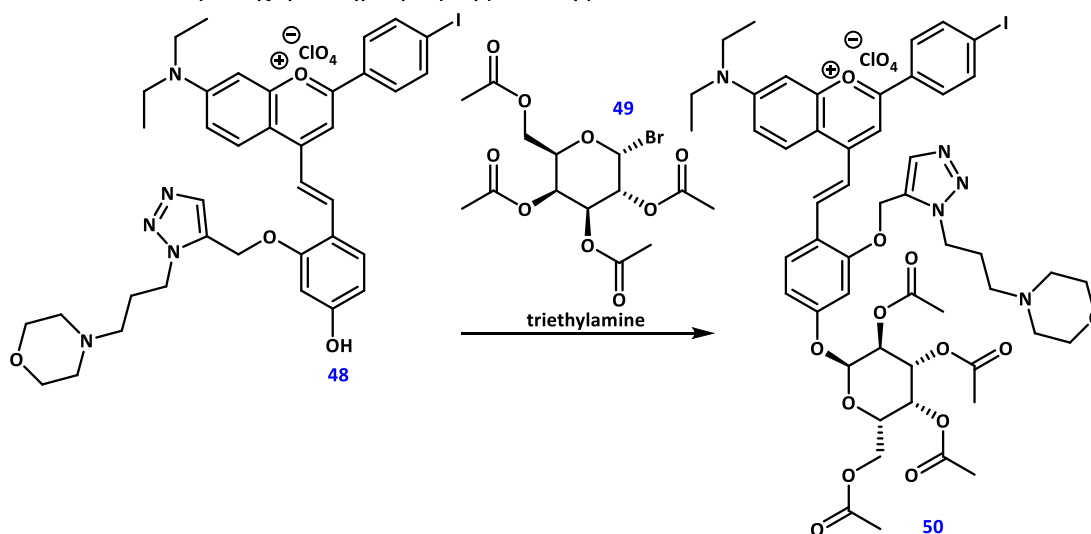
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 11.18-10.52 (m, 1H, OH-30), 10.22-9.5 (m, 1H, H-37), 8.52-8.44 (d, $J=15.5$ Hz, 1H, H-19), 8.39-8.37 (s, 1H, H-29), 8.33-8.30 (s, 1H, H-12), 8.26-8.22 (d, $J=10.0$ Hz, 1H, H-6), 8.22-8.17 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, H-17), 8.17-8.12 (d, $J=15.5$ Hz, 1H, H-14), 8.11-8.07 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, H-16), 7.85-7.81 (d, $J=8.6$ Hz, 1H, H-25), 7.31-7.26 (m, 2H, H-5, H-9), 6.83-6.79 (d, $J=1.8$ Hz, 1H, H-22), 6.65-6.61 (dd, $J=8.4$ Hz, $J=1.8$ Hz, 1H, H-24), 5.41-5.38 (s, 2H, H-27), 4.57-4.51 (t, $J=7.0$ Hz, 2H, H-34), 4.05-3.83 (br, 2H, H-39b), 3.76-3.67 (m, 6H, H-2, H-39a), 3.18-2.96 (m, 4H, H-36, H-38a), 2.32-2.22 (q, 2H, H-35), 1.32-1.24 (t, $J=6.7$ Hz, 6H, H-1).



Εικόνα 165: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 48 σε DMSO- d_6 (100 MHz, 25 °C).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 163.95 (C-11), 161.15 (C-21), 160.84 (C-23), 158.41 (C-8), 154.98 (C-13), 144.75 (C-4), 142.41 (C-29), 138.27 (C-17), 135.09 (C-19), 129.78 (C-25), 128.89 (C-16), 128.17 (C-28), 124.83 (C-15, C-6), 116.79 (C-14), 116.51 (C-7), 116.37 (C-20), 114.18 (C-9), 109.78 (C-5), 103.10 (C-24), 101.83 (C-12), 101.08 (C-22), 96.81 (C-18), 63.45 (C-39), 61.98 (C-27), 53.42 (C-36), 51.27 (C-38), 46.87 (C-34), 45.34 (C-2), 24.10 (C-35), 12.54 (C-1).

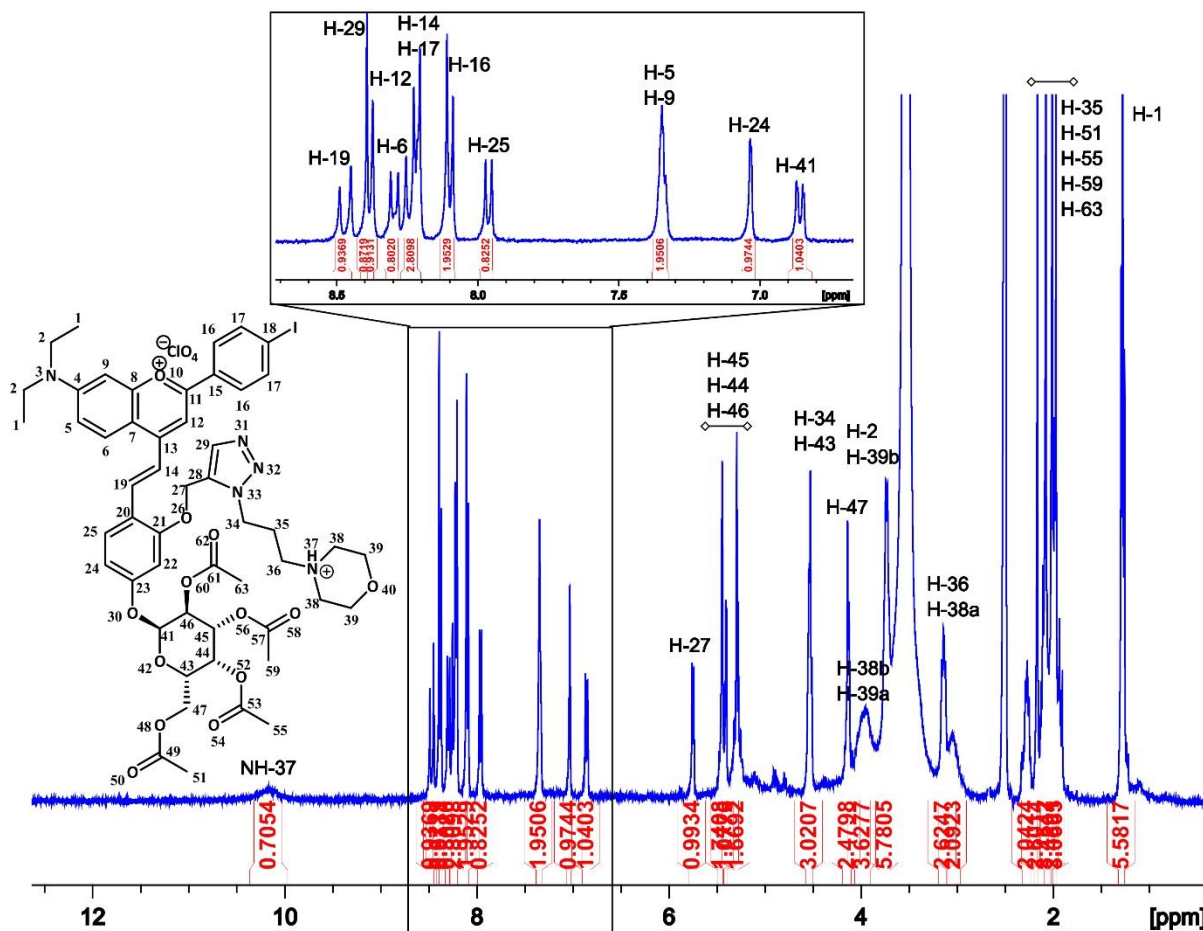
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 50



Εικόνα 166: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 50.

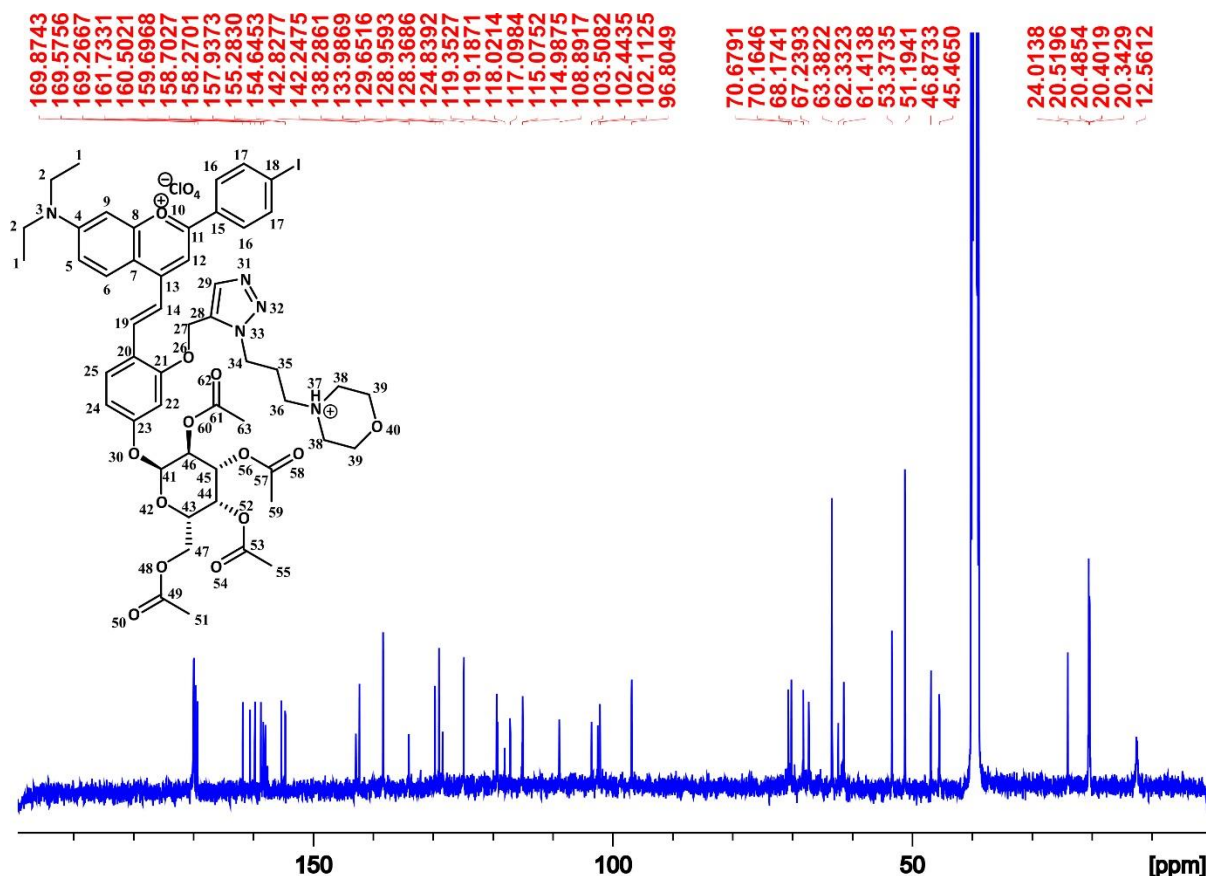
Σε παγωμένο διάλυμα της ένωσης **48** (32 mg, 0.038 mmol) σε άνυδρο MeCN (3 mL), προστέθηκε τριαιθυλαμίνη (31.6 μL , 0.22 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε για 5

λεπτά. Στη συνέχεια, ακολούθησε προσθήκη του τετρα-O-ακετυλο- α -D-γαλακτοπυρανοσυλο-1-βρωμιδίου (124.3 mg, 0.302 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε υπό ατμόσφαιρα αζώτου επιπλέον για 15 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με TLC χρωματογραφία με σύστημα διαλυτών MeOH/CH₂Cl₂ (5% v/v). Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό υψηλό κενό και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με HPLC (από 55:45 H₂O: ACN έως 05: 95 H₂O: ACN, 550 nm) για να παραλάβουμε το επιθυμητό προϊόν σαν μωβ στερεό (14.5 mg, 32 %). Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **50** μέσω φασματοσκοπίας NMR.



Εικόνα 167: Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης **50** σε DMSO-d₆ (400 MHz, 25 °C).

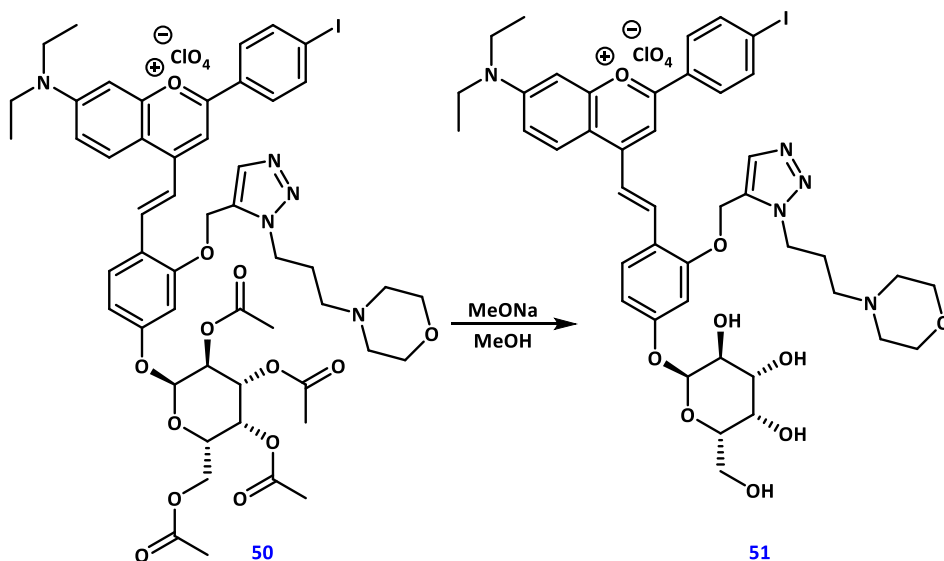
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 10.04-10.00 (br, 1H, NH-37), 8.51-8.45 (d, J =15.8 Hz, 1H, H-19), 8.41-8.39 (s, 1H, H-29), 8.39-8.37 (s, 1H, H-12), 8.32-8.28 (d, J =10 Hz, 1H, H-6), 8.27-8.20 (m, 3H, H-14, H-17), 8.13-8.08 (d, J =8.6 Hz, 2H, H-16), 7.99-7.95 (d, J =8.6 Hz, 1H, H-25), 7.38-7.32 (m, 2H, H-5, H-9), 7.06-7.03 (dd, J =1.8 Hz, 1H, H-22), 6.9-6.84 (dd, J =8.4 Hz, J =1.8 Hz, 1H, H-24), 5.78-5.74 (d, J =6.8 Hz, 1H, H-41), 5.48-5.44 (s, 2H, H-27), 5.43-5.40 (d, J =2.3 Hz, 1H, H-45), 5.32-5.28 (m, 2H, H-44, H-46), 4.58-4.50 (m, 3H, H-43, H-43), 4.17-4.12 (m, 2H, H-47), 4.08-3.88 (m, 4H, H-38b, H-39a), 3.79-3.70 (m, 6H, H-39b, H-2), 3.19-3.11 (m, 2H, H-36), 3.09-3.00 (br, 2H, H-38a), 2.32-2.24 (q, 2H, H-35), 2.20-2.16 (s, 3H, H-51), 2.09-2.07 (s, 3H, H-55), 2.03-2.01 (s, 3H, H-59), 1.99-1.97 (s, 3H, H-63), 1.32-1.26 (t, J =6.7 Hz, 6H, H-1).



Εικόνα 168: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 50 σε DMSO- d_6 (100 MHz, 25 °C).

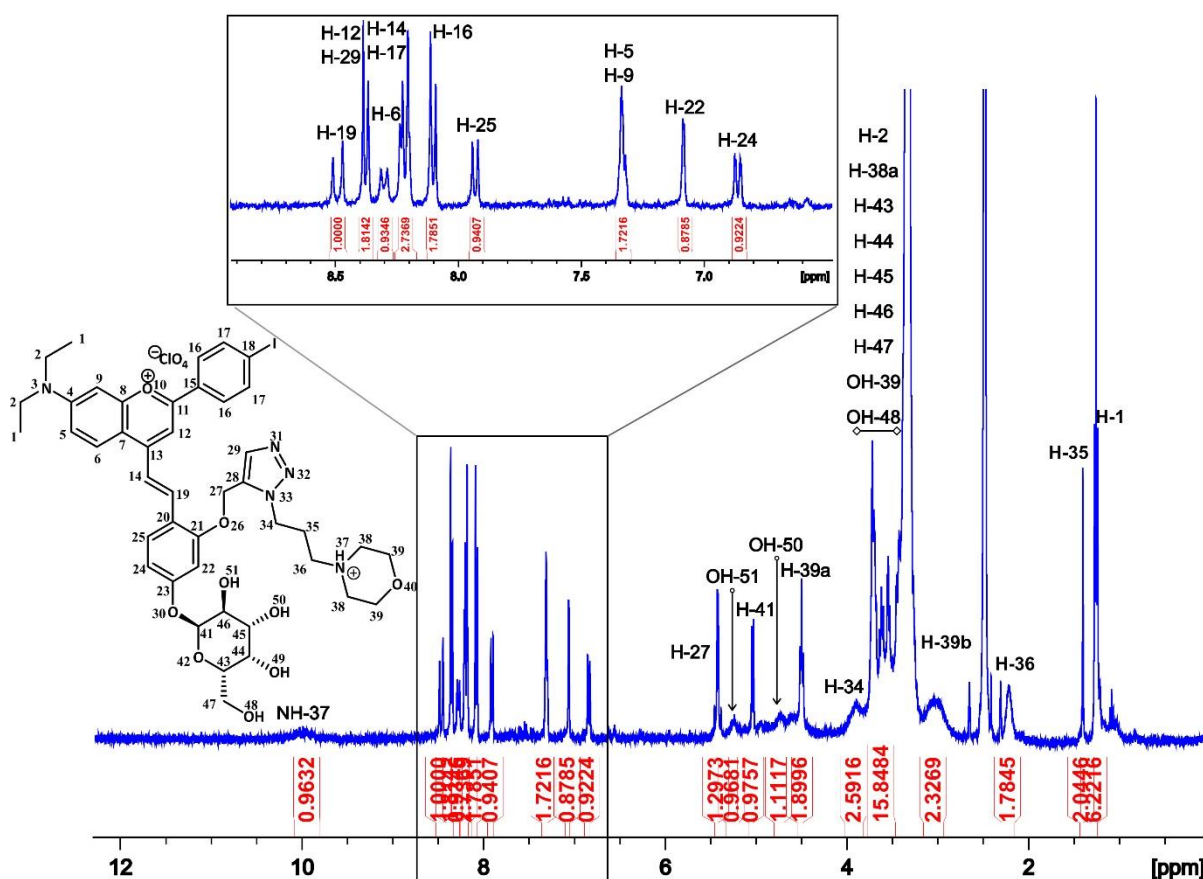
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 169.95 (C-49), 169.87 (C-61), 169.57 (C-57), 169.27 (C-53), 161.73 (C-11), 159.69 (C-21), 158.70 (C-23), 158.27 (C-8), 157.94 (C-13), 155.28 (C-4), 154.64 (C-29), 142.83 (C-17), 142.25 (C-19), 138.29 (C-16), 133.99 (C-25), 129.65 (C-28), 128.96 (C-15), 128.37 (C-6), 124.84 (C-14), 119.19 (C-7), 117.10 (C-20), 115.07 (C-9), 114.99 (C-5), 108.89 (C-24), 103.51 (C-41), 102.44 (C-12), 102.11 (C-22), 96.80 (C-18), 70.16 (C-43), 68.17 (C-45), 67.24 (C-27), 63.38 (C-39), 62.33 (C-46), 61.41 (C-44), 53.37 (C-36), 51.19 (C-38), 46.87 (C-34), 45.46 (C-2), 24.01 (C-35), 20.52 (C-51), 20.48 (C-63), 20.40 (C-59), 20.34 (C-55), 12.54 (C-1).

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 51



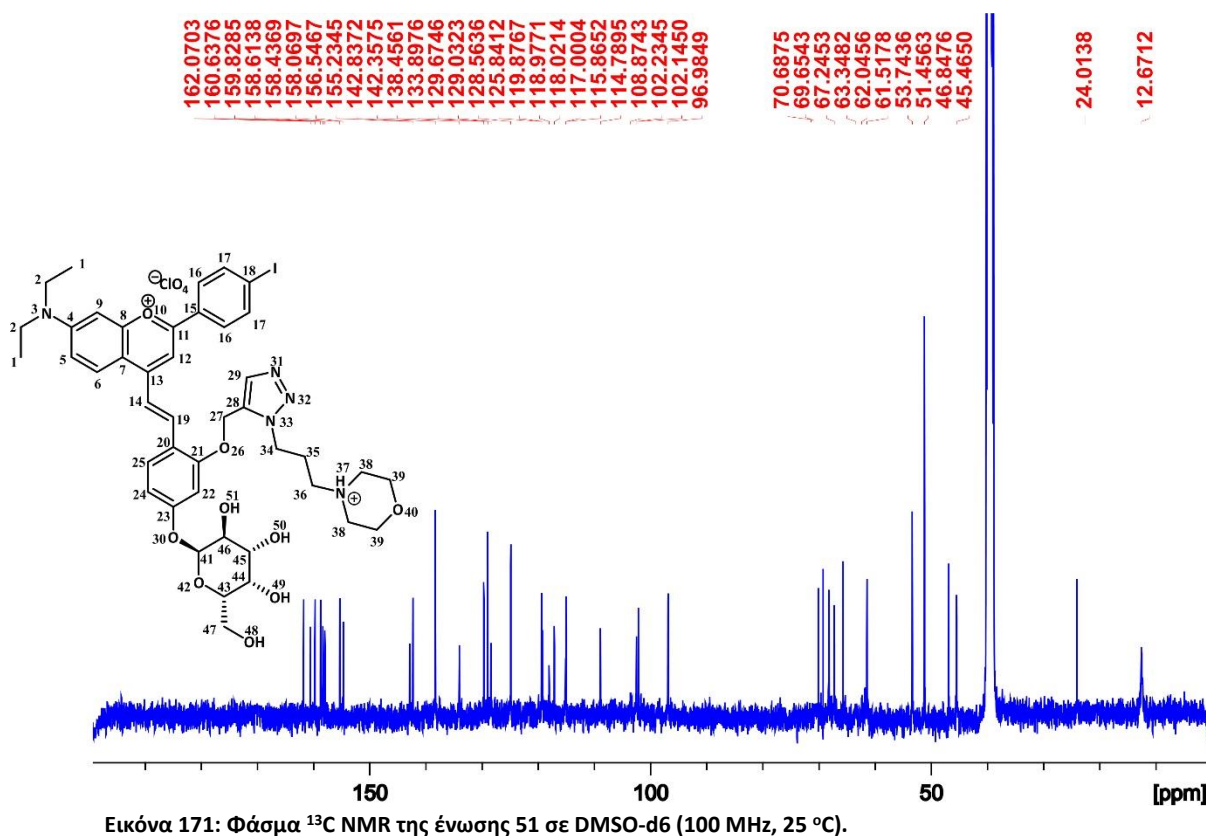
Εικόνα 169: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 51.

Σε παγωμένο διάλυμα της ένωσης **50** (12.5 mg, 0.0106 mmol) σε άνυδρη MeOH (2 mL), προστέθηκε μεθοξείδιο του νατρίου (3.44 mg, 0.064 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με TLC χρωματογραφία με σύστημα διαλυτών 30% νερό/προπανόλη, v/v. Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό υψηλό κενό και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με HPLC (από 90:10 H₂O: ACN έως 30: 70 H₂O: ACN, 550 nm) για να παραλάβουμε το επιθυμητό προϊόν σαν μωβ στερεό (1.4 mg, 13 %). Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **51** μέσω φασματοσκοπίας NMR και φασματομετρία μάζης.

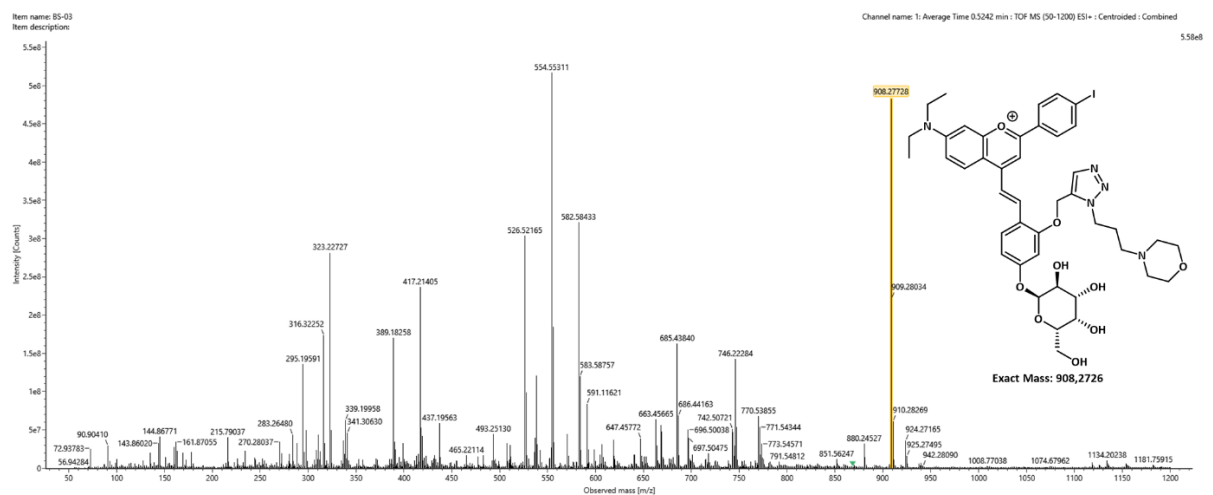


Εικόνα 170: Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης **51** σε DMSO-d₆ (400 MHz, 25 °C).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.22-9.23 (br, 1H, NH-37), 8.52-8.44 (d, J=15.8 Hz, 1H, H-19), 8.40-8.34 (d, J=7.8 Hz, 2H, H-12, H-29), 8.32-8.27 (d, J=10.17 Hz, 1H, H-6), 8.25-8.18 (m, 3H, H-14, H-17), 8.13-8.08 (d, J=8.49 Hz, 2H, H-16), 7.95-7.90 (d, J=8.78 Hz, 1H, H-25), 7.36-7.30 (m, 2H, H-5, H-9), 7.09-7.07 (d, J=1.97 Hz, 1H, H-22), 6.88-6.83 (dd, J=8.49 Hz, J=1.97 Hz, 1H, H-24), 5.46-5.42 (d, J=3.60 Hz, 1H, H-27), 5.32-5.19 (br, 1H, OH-51), 5.08-5.04 (d, J=7.8 Hz, 1H, H-41), 4.79-4.68 (br, 1H, OH-50), 4.55-4.48 (t, J=6.63 Hz, 2H, H-39a), 4.01-4.81 (br, 2H, H-34), 3.77-3.43 (m, 16H, H-2, H-38a, H-43, H-44, H-45, H-46, H-47, OH-39, OH-48), 3.15-2.94 (br, 2H, H-39b, H-36), 3.19-3.11 (m, 2H, H-36), 2.29-2.14 (br, 2H, H-38b), 1.45-1.39 (s, 2H, H-35), 1.31-1.24 (t, J=7.14 Hz, 6H, H-1).



^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.07 (C-11), 160.44 (C-21), 159.83 (C-23), 158.61 (C-8), 158.44 (C-13), 156.55 (C-4), 155.23 (C-29), 142.84 (C-17), 142.36 (C-19), 138.46 (C-16), 133.90 (C-25), 129.67 (C-28), 129.03 (C-15), 128.56 (C-6), 125.84 (C-14), 118.98 (C-7), 117.00 (C-20), 115.86 (C-9), 114.79 (C-5), 108.87 (C-24), 102.23 (C-41), 102.14 (C-12, C-22), 96.80 (C-18), 70.69 (C-43), 69.65 (C-45), 67.24 (C-27), 63.35 (C-39), 62.04 (C-46), 61.52 (C-44), 53.74 (C-36), 51.46 (C-38), 46.85 (C-34), 45.46 (C-2), 24.01 (C-35), 12.67 (C-1).

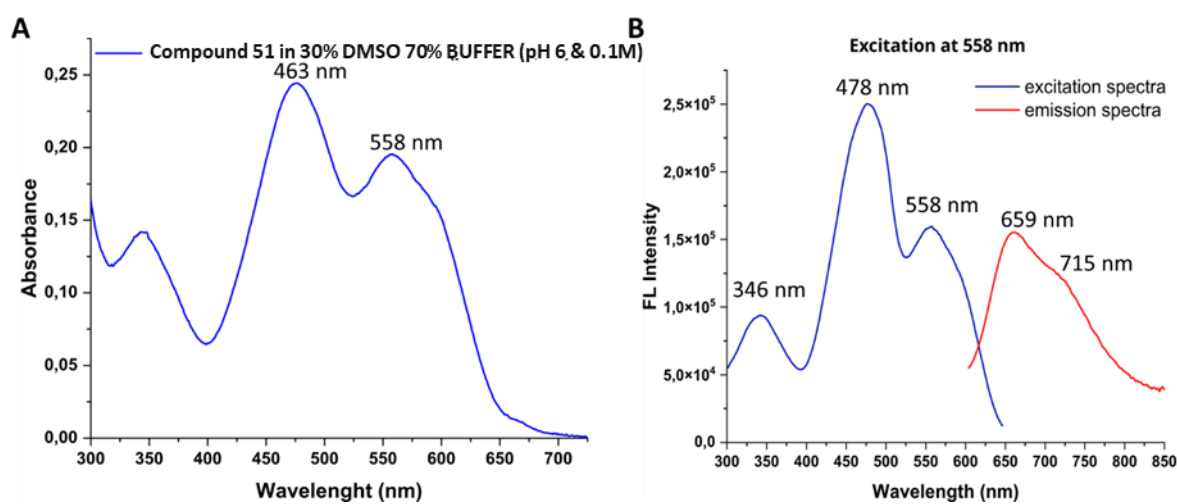


Εικόνα 172: Φάσμα μάζης υψηλής ανάλυσης της ένωσης 51. Το m/z 908.28 αντιστοιχεί στο $[\text{M}+\text{H}]^+$ και το m/z 924.27 αντιστοιχεί στο $[\text{M}+\text{H}]^+$ του οξειδωμένου αναλόγου.

Από το φάσμα μάζης αναμέναμε ένα θραύσμα σε m/z 908,2726. Λάβαμε ένα θραύσμα σε m/z 908,27728 που πιθανά αφορά το $[\text{M}]^+$.

2.5.2 Φασματοσκοπικές ιδιότητες και εκλεκτικότητα της ένωσης 51

Προκειμένου να αξιολογήσουμε τις φασματοσκοπικές ιδιότητες της ένωσης **51**, πραγματοποιήθηκαν πειράματα τόσο με φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους όσο και με φασματοσκοπία φθορισμού. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα της ένωσης (10 μM σε DMSO: PB, 3:7, 10 mM pH 6.00), για να μελετήσουμε τις φασματοσκοπικές της ιδιότητες σε περιβάλλον που να προσομοιάζει εκείνο των λυσοσωμάτων. Παρατηρούμε ότι εμφανίζει ένα διακριτό φάσμα απορρόφησης με το λ_{max} να εστιάζεται στα 463 και στα 558 nm. Επίσης, μελετήθηκαν τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής με λ_{exc} 558 nm και λ_{em} 659 nm. Τέλος, υπολογίστηκε η μετατόπιση Stokes ίση με 101 nm. Στο σημείο αυτό να σημειώσουμε ότι επιλέχθηκε σαν λ_{exc} τα 558 nm επειδή πιστεύουμε ότι η προηγούμενη κορυφή αφορά το στοιχείο του φθορογόνου πυρήνα.

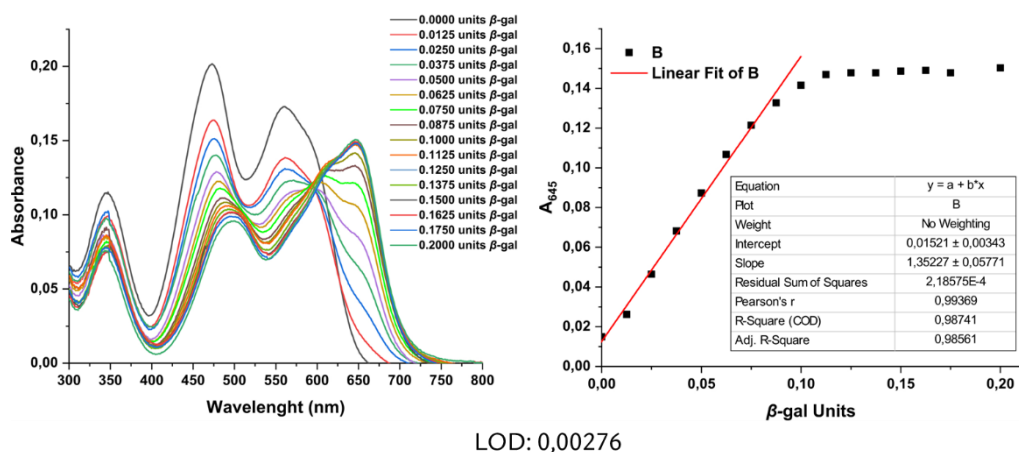


Εικόνα 173: Φάσματα Α) Απορρόφησης και Β) Φθορισμού της ένωσης της ένωσης **51** (10 μM) του δείγματος σε σε DMSO: PB (10 mM, pH 6.00, 3:7 v/v) σε θερμοκρασία 37 °C και step 2, ExBw: 5, EmBw: 5.

Πίνακας 11: Μήκη κύματος απορρόφησης, διέγερσης, εκπομπής και μετατόπιση Stokes της ένωσης **51**.

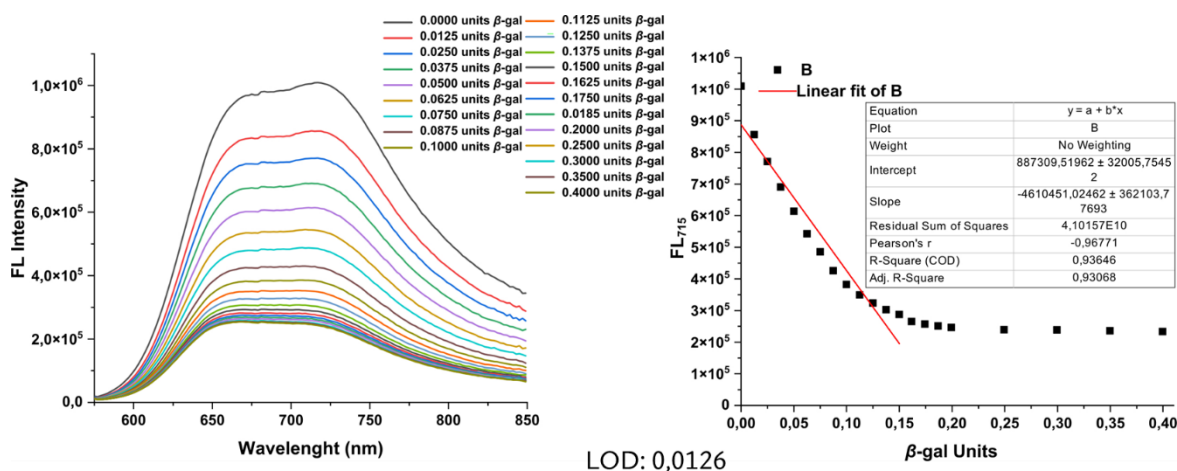
λ_{abs} (nm)	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emission}}$ (nm)	Stokes shift (nm)
463 & 558	558	659	101

Προκειμένου να παρακολουθήσουμε την απόκριση της ένωσης **51** έναντι της SA- β -γαλακτοσιδάσης πραγματοποιήθηκαν πειράματα τιτλοδότησης μέσω φασματοσκοπίας ορατού υπεριώδους και φθορισμού. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 174 A** η ένωση **51** σε DMSO: PB (3:7, 10 mM pH 6.00) εμφανίζει ένα διακριτό φάσμα απορρόφησης με το λ_{max} να εστιάζεται στα 558 nm. Κατόπιν σταδιακής προσθήκης του ενζύμου (έως 0.20 U) παρατηρήθηκε μια διακριτή βαθυχρωμική μετατόπιση της τάξης των 92 nm, συνοδευόμενο από τη παρουσία ενός ισοβεστικού σημείου στα 605 nm. Αυτή η μεταβολή στο φάσμα απορρόφησης μπορεί να εξηγηθεί από την υδρόλυση του σακχάρου που βρίσκεται στην φαινολική υδροξυλομάδα της ένωσης **51** με αποτέλεσμα τον μετασχηματισμό της στην ένωση **48**. Το όριο ανίχνευσης της ένωσης **51** υπολογίστηκε ίσο με 0.00276 U υποδεικνύοντας ότι η ένωση διαθέτει υψηλή ευαισθησία στην υπερέκφραση της β -gal.



Εικόνα 174: Α) Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 51 10 μM σε DMSO: PBS (10 mM, pH 6.00, 3:7 v/v). παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης β-γαλακτοσιδάσης Β) Απόκριση του σήματος απορρόφησης στο A_{645} παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης β-γαλακτοσιδάσης, σε θερμοκρασία 37°C.

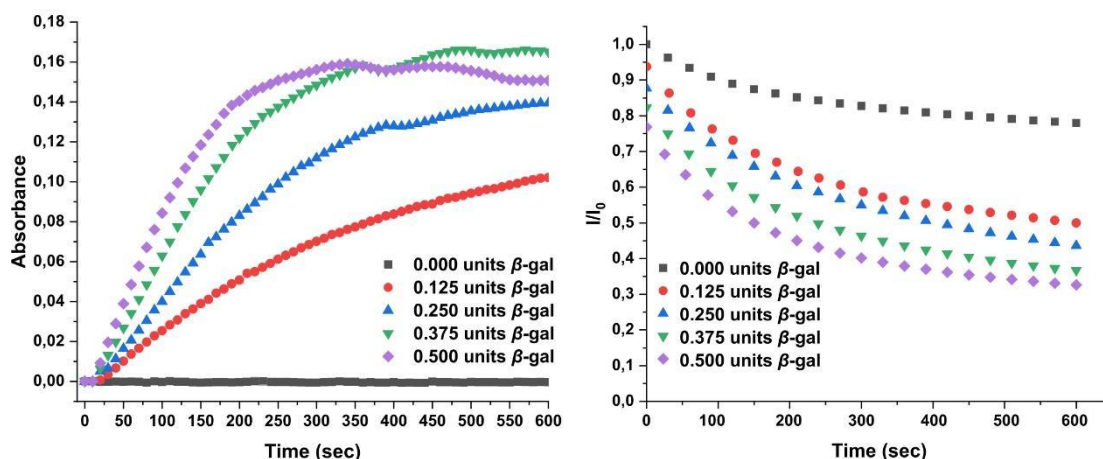
Στη συνέχεια, αξιολογήσαμε την απόκριση της ένωσης 51 μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού κατόπιν διέγερσης στα 558 nm και με σταδιακή προσθήκη του ενζύμου (0.0-0.4 U). Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 175 Α** καταγράφηκε μια αξιοσημείωτη μείωση του φάσματος φθορισμού κατά περίπου 3.8 φορές στα nm αυτά, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην υδρόλυση του σακχάρου από το ένζυμο. Το όριο ανίχνευσης της ένωσης 51 υπολογίστηκε ίσο με 0.0126 U υποδεικνύοντας ότι η ένωση διαθέτει υψηλή ευαισθησία στην υπερέκφραση της β-gal.



Εικόνα 175: Α) Φάσμα φθορισμού της ένωσης 51 (10 μM) σε DMSO: PBS (10 mM, pH 6.00, 3:7 v/v). παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης β-γαλακτοσιδάσης κατόπιν διέγερσης στα 558 nm Β) Απόκριση του σήματος απορρόφησης στο A_{715} παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης β-γαλακτοσιδάσης, σε θερμοκρασία 37°C, με step 2, ExBw: 10, EmBw: 10.

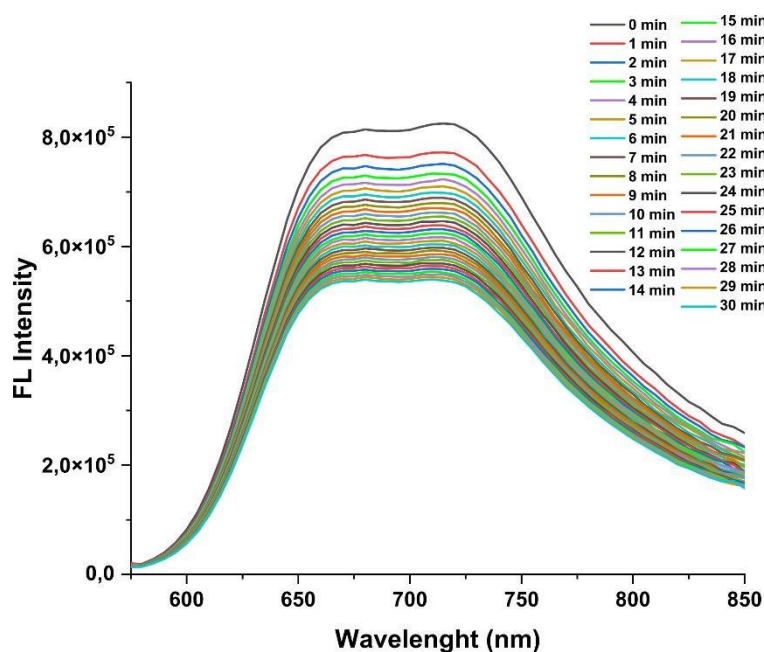
Η μεταβολή φαίνεται να είναι πιο έντονη μελετώντας τα φάσματα απορρόφησης και όχι τόσο του φθορισμού. Και αυτή η ένωση όπως και η προηγούμενη παρουσίασε αλλαγή στο χρώμα του διαλύματός της, ορατή με γυμνό οφθαλμό, παρουσιάζοντας χρωματομετρικές ιδιότητες.

Προκειμένου να αξιολογήσουμε τον ρυθμό απόκρισης της ένωσης 51 παρουσία β-gal πραγματοποιήθηκαν πειράματα κινητικής παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του ενζύμου.



Εικόνα 176: Α) υν- ν is κινητική μελέτη της ένωσης 51 σε DMSO: PBS (10 mM, pH 6.00, 3:7 v/v) παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης β -γαλακτοσιδάσης (λ_{abs} 639 nm Β) FL κινητική μελέτη της ένωσης 17 σε DMSO: PBS (10 mM, pH 6.00, 3:7 v/v) παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης β -γαλακτοσιδάσης με λ_{em} 660 nm, σε θερμοκρασία 37 °C.

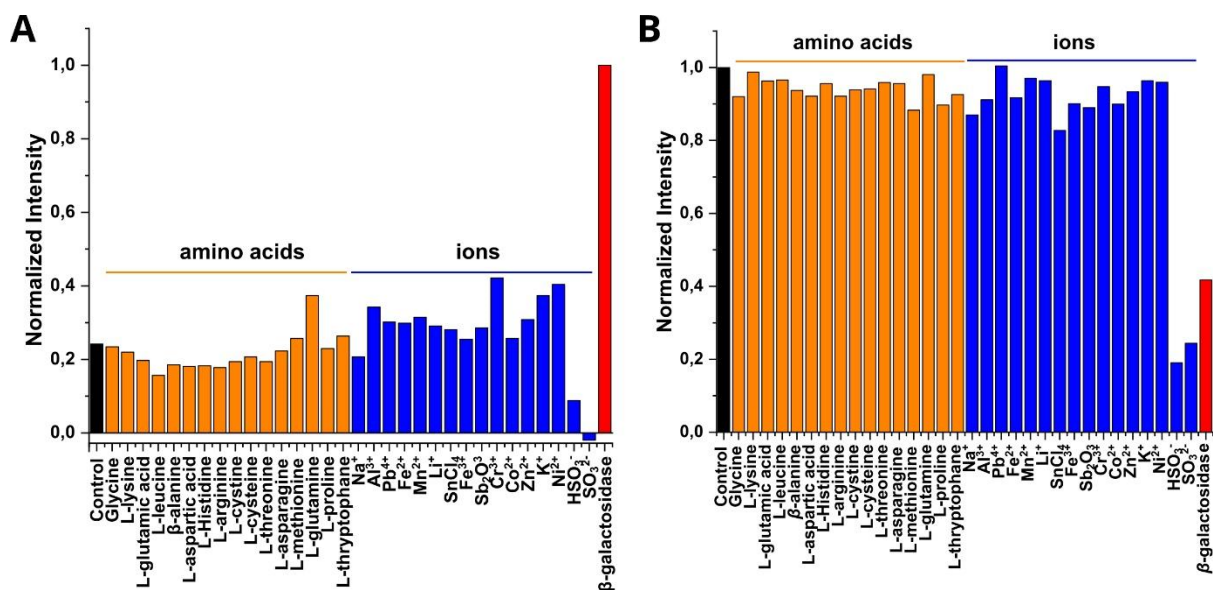
Στο επόμενο βήμα, καταγράψαμε το φάσμα φθορισμού της ένωσης 51 συναρτήσει του χρόνου παρουσία 0.05 U β -gal για μισή ώρα. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 177** το σήμα φθορισμού της ένωση 51 σταδιακά μειωνόταν κατόπιν διέγερσης στα 558 nm.



Εικόνα 177: Φάσμα φθορισμού της ένωσης 51 σε DMSO: PB (10 mM, pH 6.00, 3:7 v/v) (0-30 min) κατόπιν διέγερσης στα 558 nm ύστερα από προσθήκη 0.05 U β -γαλακτοσιδάσης σε θερμοκρασία 37°C, με step 2, ExBw: 10, EmBw: 10.

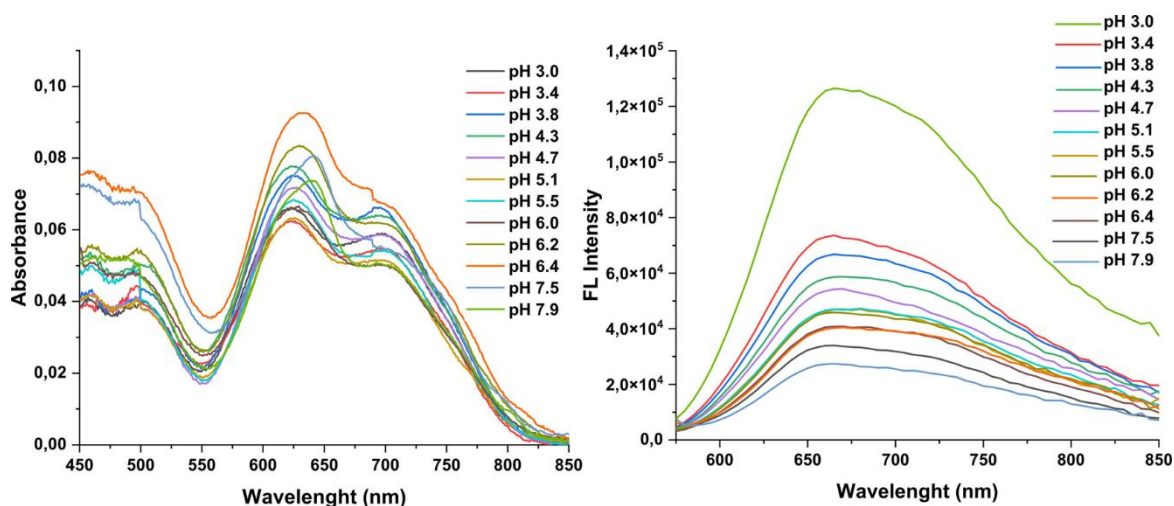
Έπειτα παρουσιάζονται τα πειράματα εκλεκτικότητας της ένωσης παρουσία διαφορετικών αναλυτών συμπεριλαμβανομένων μετάλλων (K^+ , Na^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{4+} , Al^{3+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Sb^{3+} , Sn^{4+}), αμινοξέων (ιστιδίνη, λευκίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, προλίνη, θρεονίνη, τρυπτοφάνη, κυστεΐνη, γλουταμινικό οξύ, γλουταμίνη, γλυκίνη, γλουταθειόνη, αλανίνη, αργινίνη, ασπαραγίνη, ασπαρτικό οξύ) και ορισμένων υπεροξειδίων του θείου (HSO_3^- , SO_3^{2-}) και φυσικά της β -γαλακτοσιδάσης. Η αξιολόγηση έλαβε χώρα με φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους παρακολουθώντας την μεταβολή στα 646 nm. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 178**, ο λόγος αυτός

δεν εμφάνισε ιδιαίτερη μεταβολή με την προσθήκη άλλων αναλυτών (100 μM) πέραν της β -gal, υποδεικνύοντας υψηλή εκλεκτικότητα της ένωσης.



Εικόνα 178: Απόκριση του σήματος Α) Απορρόφησης και Β) Φθορισμού (I/I₀ στα 639 nm) της ένωσης 51 (10 μM) έναντι διαφόρων αναλυτών (100 μM), σε DMSO: PBS (10 mM, pH 6.00, 3:7 v/v) σε θερμοκρασία 37 °C.

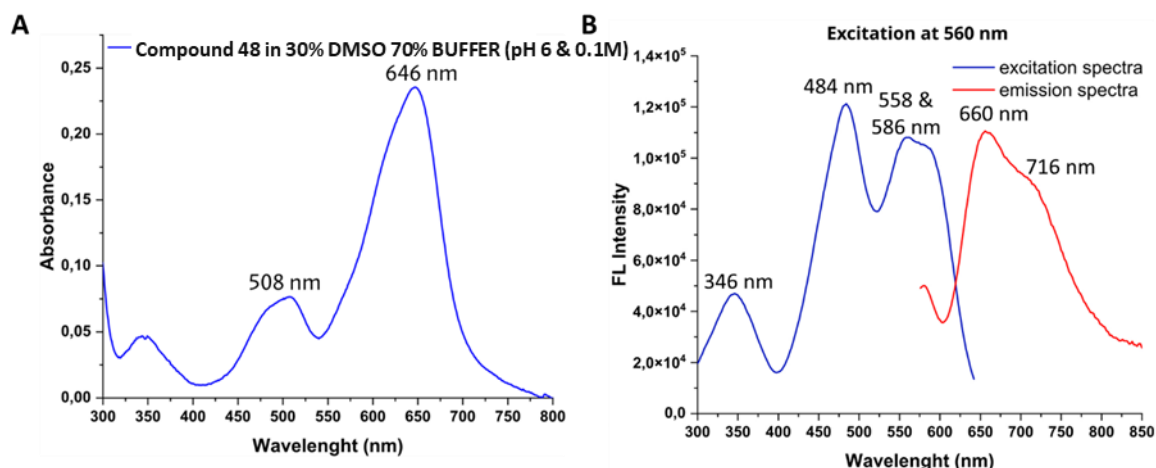
Επίσης, μελετήθηκε η απόκριση της ένωσης σε διαφορετικά pH, τόσο με φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους όσο και με φασματοσκοπία φθορισμού. Παρατηρήσαμε, λοιπόν, ότι σε όξινα περιβάλλοντα η ένωση εμφανίζει καλύτερες φωτοφυσικές ιδιότητες αυξάνοντας την ένταση του φθορισμού της κατά περίπου 4.6 φορές στα 665 nm. Αυτό πιθανόν οφείλεται στην πρωτονίωση της διαιθυλαμινό-ομάδας του χρωμοφόρου πυρήνα. Η πρωτονίωση αυτή αλλάζει την φύση του ενός δότη με συνέπεια την παρατηρούμενη αλλαγή στην ένταση τόσο της απορρόφησης όσο και της εκπομπής του μορίου.



Εικόνα 179: Α) Φάσμα απορρόφησης και Β) Φάσματα φθορισμού της ένωσης της ένωσης 51 (10 μM) σε διαφορετικά pH (από 3.0 έως 7.9) κατόπιν διέγερσης στα 554 nm, σε θερμοκρασία 25°C., με step 2, ExBw: 5, EmBw: 5. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί buffer phosphate-citrate.

Αφού ολοκληρώθηκαν τα πειράματα στην ένωση **51** μελετήθηκε η ένωση που προκύπτει μετά την υδρόλυση από το ένζυμο. Πειράματα έλαβαν χώρα τόσο με φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους όσο και με φθορισμό. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα της ένωσης (10 μM σε

DMSO: PB (3:7, 10 mM pH 6.00), για να μελετήσουμε τις φασματοσκοπικές της ιδιότητες σε περιβάλλον που να προσομοιάζει εκείνο των λυσοσωμάτων. Παρατηρούμε ότι εμφανίζει ένα διακριτό φάσμα απορρόφησης με το $\lambda_{\max}$ να εστιάζεται στα 646 nm. Επίσης μελετήθηκαν τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής με λ_{exc} 558 nm και λ_{em} 660 nm. Τέλος, υπολογίστηκε η μετατόπιση Stokes ίση με 102 nm. Η πρώτη παρατήρηση που μπορούμε να κάνουμε σε αυτό το σημείο ότι το φάσμα υπ-vis αλλάζει αρκετά εμφανίζοντας μια νέα κορυφή στα 646 nm ενώ το φάσμα διέγερσης και εκπομπής είναι παρόμοιο.

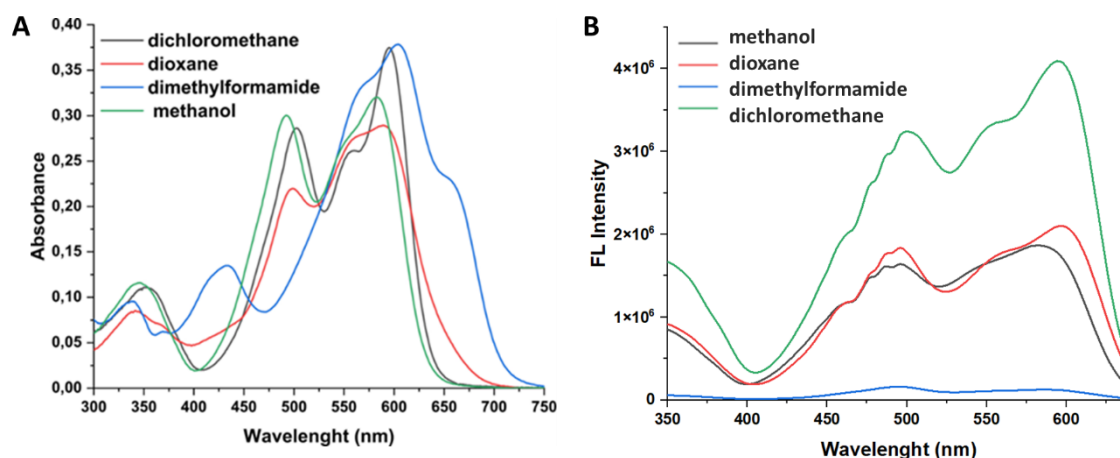


Εικόνα 180: Φάσματα Α) Απορρόφησης και Β) Φθορισμού της ένωσης της ένωσης 48 (10 μM) του δείγματος σε DMSO: PBS (10 mM, pH 6.00, 3:7 v/v) σε θερμοκρασία 37 °C και step 2, ExBw: 5, EmBw: 5.

Πίνακας 12: Μήκη κύματος απορρόφησης, διέγερσης, εκπομπής και μετατόπιση Stokes της ένωσης 48.

λ_{abs} (nm)	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emission}}$ (nm)	Stoke shift (nm)
646	558	660	102

Στη συνέχεια μελετήθηκε η συμπεριφορά της ένωσης σε διάφορους διαλύτες προκειμένου να προβλέψουμε την ανταπόκριση της σε διαφορετικά περιβάλλοντα π.χ., με διαφορά στην πολικότητα. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα. Δεν παρατηρούμε κάποια χαρακτηριστική μετατόπιση στο κόκκινο όσο αυξάνεται η πολικότητα του διαλύτη. Επομένως συμπεραίνουμε ότι η ένωση δεν λειτουργεί μέσω του φαινομένου TICT. Σαν πρώτη εικόνα λοιπόν δεν μπορούμε να βγάλουμε κάποιο άλλο συμπέρασμα γι' αυτό και προχωρήσαμε σε επόμενα πειράματα για την μεταβολή της σε περιβάλλον διαφορετικού ιξώδους και πολικότητας.

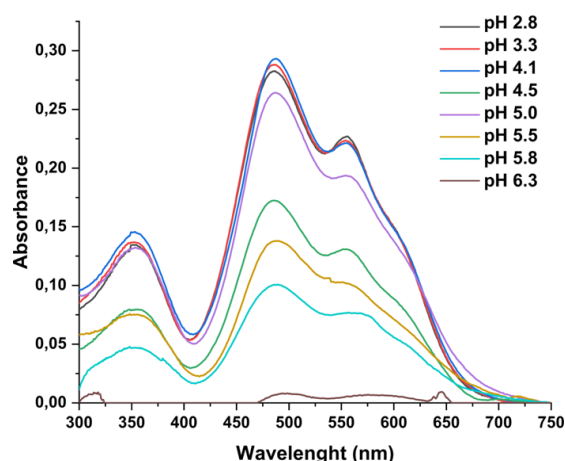


Εικόνα 181: Φάσματα Α) απορρόφησης, Β) φθορισμού της ένωσης 48 (10 μM) του δείγματος σε μη πολικό διαλύτη, σε πολικό απρωτικό διαλύτη και σε πολικό πρωτικό διαλύτη. Το σχήμα περιγράφει τα φάσματα του ανιχνευτή παρουσία φαινομένων διαλυτοποίησης.

Πίνακας 13: Μήκη κύματος απορρόφησης και εκπομπής της ένωσης 48 συναρτήσει του διαλύτη.

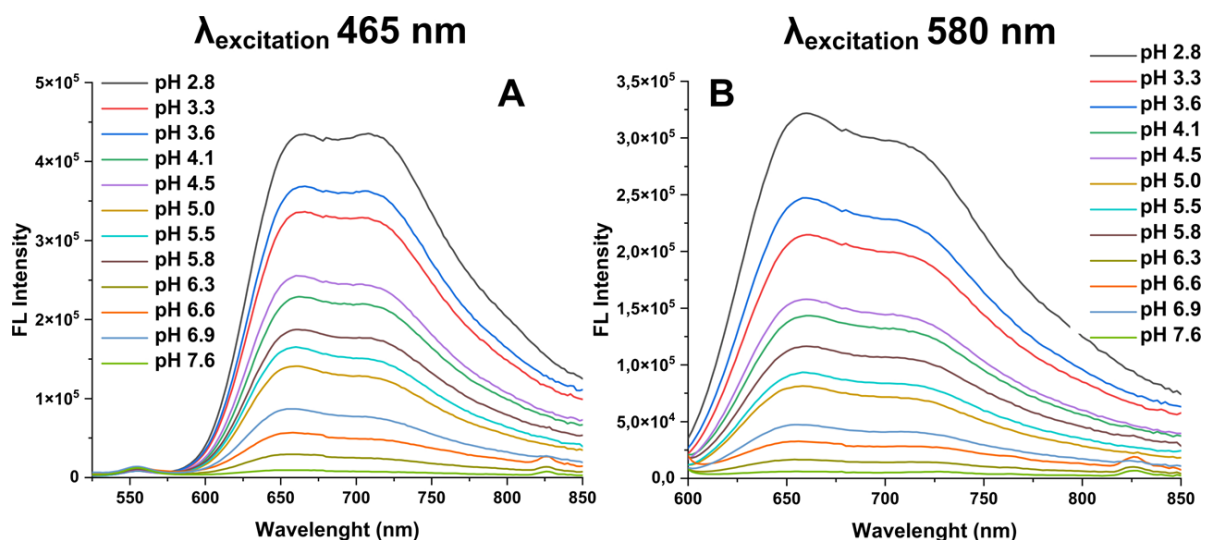
Διαλύτης	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)
Διοξάνιο (dioxane) Μη πολικός διαλύτης	651	598
Διμεθυλφορμαμίδιο (dimethylformamide) Πολικός απρωτικός διαλύτης	658	596
Διχλωρομεθάνιο (dichloromethane) Πολικός απρωτικός διαλύτης	690	596
Μεθανόλη (methanol) Πολικός πρωτικός διαλύτης	651	584

Για να προβούμε σε μία σύγκριση με τα πειράματα που έχουν ήδη παρουσιαστεί σχετικά με την ένωση **51** πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε διαφορετικά pH. Προκειμένου να λάβουν χώρα τα πειράματα προετοιμάστηκαν διαλύματα από Citrate Buffer διαφορετικού pH [Stocks solutions: A) 0.1 M solution of citric acid, B) 0.1 M solution of sodium citrate] [123]. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με εκείνα της ένωσης **51**, παρουσιάζοντας αύξηση της έντασης φθορισμού όσο μειώνεται το pH.



Εικόνα 182: Α) Φάσμα απορρόφησης της ένωσης της ένωσης 48 (10 μM) σε διαφορετικά pH (από 2.8 έως 6.3), σε θερμοκρασία 25°C. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί buffer phosphate-citrate.

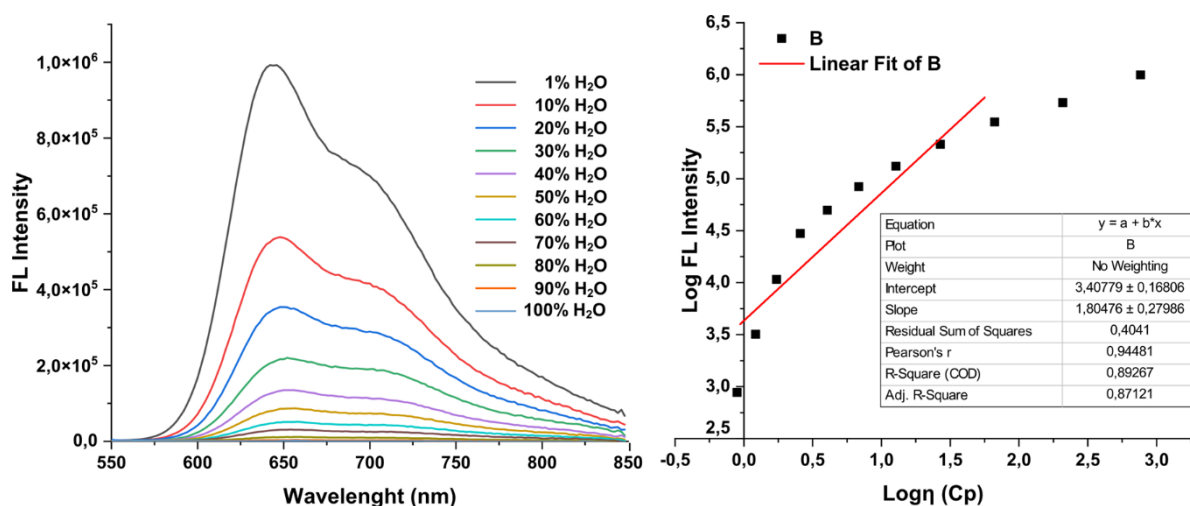
Πιο συγκεκριμένα, με διέγερση στα 465 nm παρατηρήσαμε αύξηση του φθορισμού κατά περίπου 58 φορές στα 710 nm. Με διέγερση στα 580 nm παρατηρήσαμε αύξηση του φθορισμού κατά περίπου 54 φορές στα 660 nm.



Εικόνα 183: Φάσματα φθορισμού της ένωσης της ένωσης 48 (10 μM) σε διαφορετικά pH (από 2.8 έως 7.6) κατόπιν διέγερσης Α) στα 465 και Β) στα 554 nm, σε θερμοκρασία 25°C., με step 2, ExBw: 10, EmBw: 10. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί buffer citrate.

Επιπλέον, προκειμένου να αξιολογήσουμε την ανταπόκριση της ένωσης **48** στη μεταβολή του ιζώδους πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού χρησιμοποιώντας διαφορετικά δυαδικά μίγματα γλυκερόλης/νερού (από 0% έως 99%) αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 184 Α**, η ένωση **48** σε αυτά τα υδατικά μέσα εμφανίζει ένα ασθενές σήμα φθορισμού. Με σταδιακή αύξηση του ποσοστού γλυκερόλης, παρατηρήθηκε ότι το σήμα φθορισμού αυξήθηκε σημαντικά (~ **1127 φορές**).

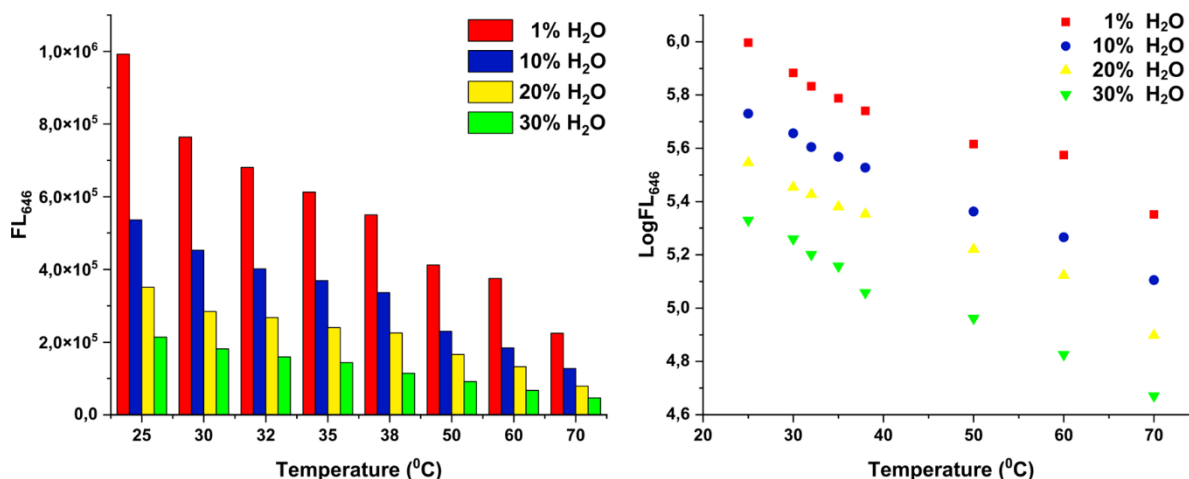
Επιπρόσθετα, η ένταση του φθορισμού εμφάνισε εξαιρετική γραμμικότητα ($R^2 = 0.8927$) στη μεταβολή του διαλύτη από νερό ($\log \eta$ -0.05 cP) σε γλυκερόλη (99%, $\log \eta$ 2.88 cP). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ένωση **48** είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στη μεταβολή του ιζώδους και θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί σαν ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο ώστε να προσδιορίσει τη μεταβολή του ιζώδους σε ένα κυτταρικό μικροπεριβάλλον.



Εικόνα 184: Α) Φάσματα φθορισμού της ένωσης της ένωσης 48 (10 μM) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού (από 0% έως 99% γλυκερόλη) κατόπιν διέγερσης στα 535 nm. Β) Συσχετισμός του λογάριθμου της έντασης φθορισμού στα 646 nm με τον λογάριθμο του ιζώδους (η) στο ίδιο σύστημα γλυκερόλης/νερού. κατόπιν διέγερσης στα 535 nm σε θερμοκρασία 25°C, με step 2, ExBw: 2.5, EmBw: 2.5.

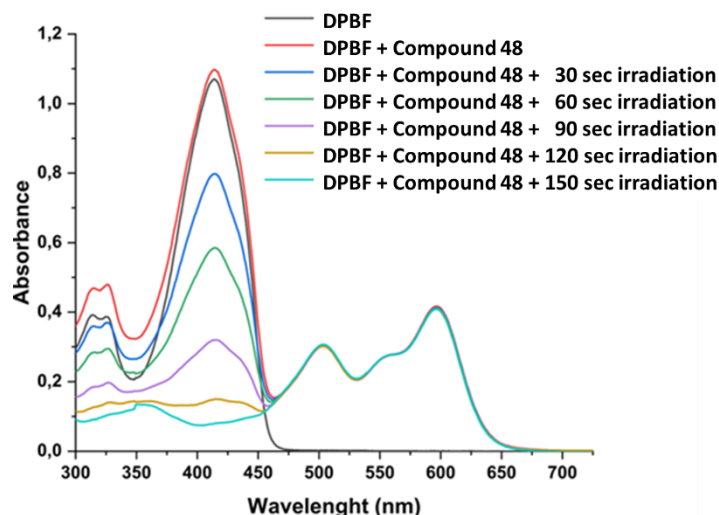
Στη συνέχεια, δεδομένου πως το ιζώδες επηρεάζεται σημαντικά από τη μεταβολή της θερμοκρασίας πραγματοποιήθηκαν συμπληρωματικές μελέτες σε διαφορετικές θερμοκρασίες [107].

Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 185 Α**, η διαφορά της έντασης του σήματος φθορισμού της ένωσης **48** στα διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού διατηρείται παρά το γεγονός ότι η θερμοκρασία αυξάνεται σημαντικά από 25 °C σε 70 °C. Επιπλέον, όπως απεικονίζεται και στην **Εικόνα 186 Β** η μεταβολή του λογαρίθμου της έντασης του φθορισμού μειώνεται σε υψηλές θερμοκρασίες ενώ παράλληλα εμφανίζεται μεγάλη γραμμικότητα ανεξάρτητα του δυαδικού συστήματος γλυκερόλης/νερού.



Εικόνα 186: Α) Συσχέτιση της μεταβολής της έντασης του φθορισμού FL₆₄₆ της ένωσης **48** (10 μM) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού με τη θερμοκρασία Β) Συσχέτιση του λογαρίθμου έντασης του φθορισμού FL₆₄₆ (10 μM) της ένωσης **48** και της θερμοκρασίας στα διαφορετικά συστήματα γλυκερόλης/νερού, με step 2, ExBw: 2.5, EmBw: 2.5.

Τέλος, θελήσαμε να εξετάσουμε την εν δυνάμει κυτταροτοξικότητα του μορίου μετά από ακτινοβολήση, μέσω φασματοσκοπίας ορατού υπεριώδους σε διάλυμα της ένωσης σε CH₂Cl₂. Το πείραμα αυτό είχε κυρίως ποιοτικό σκοπό. Πιο συγκεκριμένα, αρχικά λήφθηκε ένα φάσμα του DPBF σε CH₂Cl₂ με συγκέντρωση τέτοια ώστε η απορρόφηση του να είναι ~1 (0.05 mM). Στη συνέχεια στο ίδιο διάλυμα προστέθηκε η ένωση **48** ώστε η απορρόφηση της να είναι ~0.2 και ακολούθησε καταγραφή του φάσματος του μίγματος των δύο ενώσεων. Τέλος, το μίγμα αυτό ακτινοβολήθηκε υπό ανάδευση για διάφορα χρονικά διάστημα, ενώ ενδιάμεσα καταγράφονταν τα φάσματα απορρόφησης. Παρατηρούμε ότι για το χρονικό διάστημα από 0 έως 150 δευτερόλεπτα ακτινοβολήσης η ένταση της κορυφής του DPBF μειώνεται ραγδαία γεγονός που σημαίνει ότι παράγονται δραστικές ρίζες μονήρους οξυγόνου. Από την άλλη η ένταση της ένωσης δεν επηρεάζεται από την ακτινοβολήση επομένως θα λέγαμε ότι είναι φωτοσταθερή.



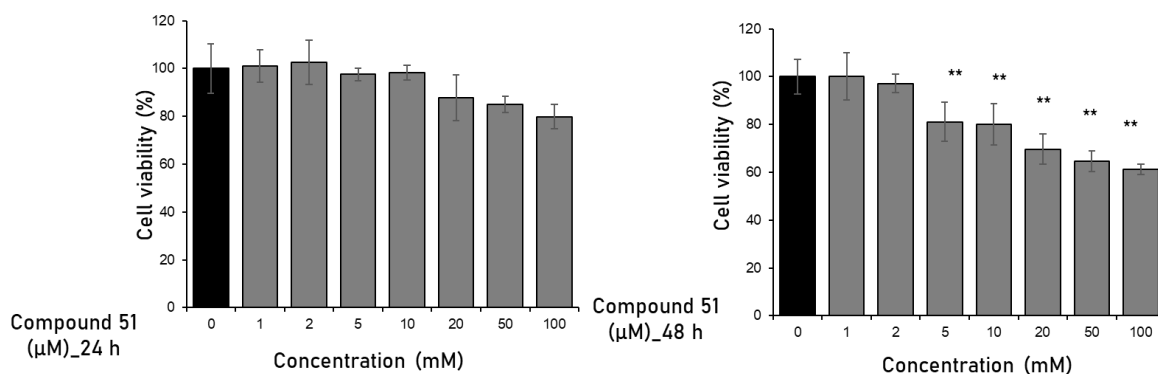
Εικόνα 187: Απόκριση του σήματος απορρόφησης της ένωσης 48 (10 μM) και του μίγματος της ένωσης 48 και του DPBF έναντι διαφορετικών χρόνων ακτινοβολήσης.

Συμπερασματικά η ένωση αυτή σχεδιάστηκε για να προσβάλει τα γηρασμένα κύτταρα που υποβοηθούν τον όγκο. Φαίνεται να ανταποκρίνεται στο ένζυμο β -gal, αλλά πολύ πιο έντονη μεταβολή έδωσε στο ιζώδες. Φαίνεται να διακατέχει εξαιρετική εν δυνάμει κυτταροτοξικότητα επαγόμενη από ακτινοβολήση και φωτοσταθερότητα σε αντίθεση με την προηγούμενη που καταστρέφονταν κατά την ακτινοβολήση.

2.5.3 Βιολογική αξιολόγηση της θεραπευτικής ένωσης 51

Αρχικά θα ήθελα να αναφέρω ότι η βιολογική αξιολόγηση της ένωσης 51 πραγματοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Ιωάννη Τρουγκάκου, Τμήμα Βιολογίας (ΕΚΠΑ).

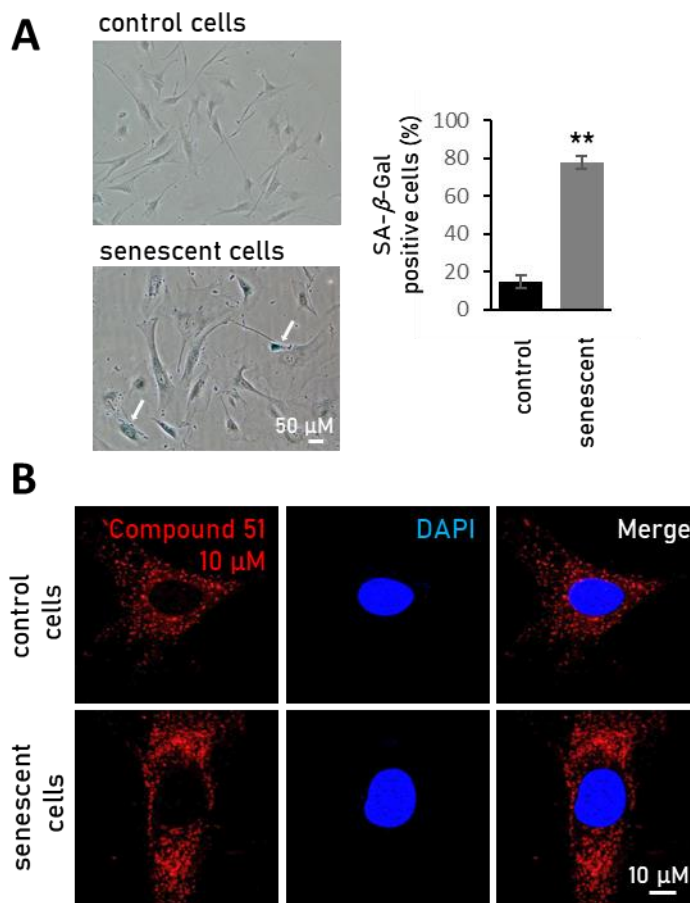
Προκειμένου λοιπόν, να αξιολογήσουμε την ένωση **51** *in vitro* προβήκαμε στον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας σε συγκεντρώσεις 1, 2, 5, 10, 20, 50 και 100 μM σε φυσιολογικούς ινοβλάστες δέρματος BJ με τη δοκιμασία MTT κατόπιν επώασης για 24 και 48 ώρες [134]. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 188** η ένωση **51** επηρέασε σε μικρό βαθμό την βιωσιμότητα των κυττάρων κυρίως σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις επιβεβαιώνοντας τη μη-τοξική συμπεριφορά του ανιχνευτή.



Εικόνα 188: Ραβδογράμματα κυτταροτοξικότητας με την δοκιμασία MTT της ένωσης 51 σε φυσιολογικούς ινοβλάστες. Οι τιμές των δειγμάτων ελέγχου ορίστηκαν στο 100%. ράβδοι, $\pm$ SD ($n \geq 2$), ** $p < 0.01$. Bars.

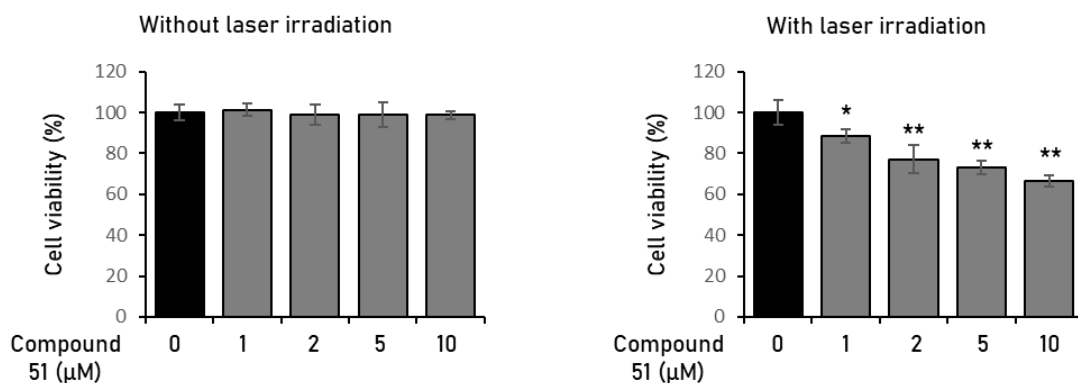
Ενθαρρυνόμενοι από τις εξαιρετικές φωτοφυσικές ιδιότητες που διαθέτει η ένωση **51** καθώς επίσης και την καλή συμβατότητα της στα κύτταρα, στη συνέχεια αξιολογήσαμε τη δυνατότητα της να απεικονίζει τα ενδογενή επίπεδα της SA- β -gal σε φυσιολογικά και σε γηρασμένα κύτταρα. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου αποτελεί το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο ερέθισμα που μπορεί να προκαλέσει κυτταρική γήρανση σε φυσιολογικές κυτταρικές σειρές και να οδηγήσει στην

υπερέκφραση της SA- β -gal [135-137]. Για τον σκοπό αυτό αναπτύξαμε ένα επαγόμενο μοντέλο πρόωρης γήρανσης με επεξεργασία των κυττάρων BJ (Human foreskin fibroblasts) με H_2O_2 . Αναλυτικότερα, οι φυσιολογικοί ινοβλάστες υποβλήθηκαν τρεις σαρανταοκτώωρες εκθέσεις με 300 μM H_2O_2 , με αποτέλεσμα το $80 \pm 7\%$ να χρωματίζονται θετικά στη χρώση SA- β -gal, επιβεβαιώνοντας το αποτελέσματα της πρόωρης γήρανσης (**Εικόνα 189 A**). Η ένωση **51** (10 μM) χορηγήθηκε στους φυσιολογικούς ινοβλάστες (κύτταρα ελέγχου) και στα κύτταρα τα οποία είχαν υποστεί πρόωρη γήρανση με χορήγηση H_2O_2 . Οι δύο ομάδες κυττάρων παρατηρήθηκαν με το ομοεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης λέιζερ (CLSM, Digital Eclipse C1 Nikon) κατόπιν διέγερσης στα 543 nm. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 189 B**, παρατηρήθηκε ισχυρός φθορισμός στην περιοχή του εγγύς υπέρυθρου στα γηρασμένα κύτταρα, ενώ στα κύτταρα ελέγχου ανιχνεύθηκε χαμηλότερος φθορισμός.



Εικόνα 189: (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες φωτεινού πεδίου μετά από χρώση SA- β -gal των κυττάρων ελέγχου ή των γηρασμένων κυττάρων, και σχετικός (%) αριθμός θετικών κυττάρων που υπερεκφράζουν την SA- β -gal. Οπτικοποίηση CLSM (B) και ποσοτικός προσδιορισμός της έντασης του φθορισμού της ένωσης 93 σε κύτταρα ελέγχου και πρόωρα γηρασμένα. Τα κύτταρα καλλιιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες και επωάστηκαν με 10 μM της ένωσης 51 για 1 ώρα. Στη συνέχεια σταθεροποιήθηκαν, χρωματίστηκαν με DAPI και τοποθετήθηκαν σε πλακίδια πριν από την παρατήρηση υπό CLSM κατόπιν διέγερσης στα 543 nm. ** $p < 0.01$. Bars.

Τέλος, ελέγξαμε την ικανότητα της ένωσης ως προς την επιλεκτική κυτταροτοξικότητά της μετά από ακτινοβολήση και την χρήση της ως φωτοεθαισθητοποιητή σε κύτταρα. Τα κύτταρα επωάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις του ανιχνευτή για 6 ώρες και στη συνέχεια ακτινοβολήθηκαν με λέιζερ για 10 λεπτά. Μετά την ακτινοβολήση τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες. Η επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμ ασία MTT.



Εικόνα 190: Ραβδογράμματα κυτταροτοξικότητας με την δοκιμασία MTT της ένωσης 51 σε φυσιολογικούς ινοβλάστες απουσία και παρουσία ακτινοβολήσης, ** $p < 0.01$. Bars.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή παρουσιάζει τον σχεδιασμό, τη σύνθεση, τον χαρακτηρισμό και την αξιολόγηση μίας διαγνωστικής και τεσσάρων νέων θεραπευτικών ενώσεων που στοχεύουν και ανταποκρίνονται στο μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε σύνθεση και χαρακτηρισμός δύο διαφορετικών φθοροφόρων μορίων- σκελετών, έναν ημικυανίνης και ένα παράγωγο άλατος φλαβυλίου, όπου εκμπεμπουν στην περιοχή του εγγύς υπερύθρου. Τα μόρια αυτά λειτουργούν ως παράγοντες απεικόνισης ενώ το παράγωγο άλατος φλαβυλίου μπορεί να χαρακτηριστεί επιπλέον και ως φωτοευαισθητοποιητής, δηλαδή μόριο που μετά από ακτινοβολήση σε κατάλληλο μήκος κύματος μπορεί να παράξει κυτταροτοξικές ρίζες οξυγόνου σε απλή κατάσταση. Επίσης, πραγματοποιήθηκε σύνθεση τεσσάρων ογκοστοχευτικών παραγόντων (ενός παράγοντα που στοχεύει τα μιτοχόνδρια, ενός που στοχεύει τα λυσοσώματα, ενός που στοχεύει τους υποδοχείς βιοτίνης και ενός που στοχεύει τους υποδοχείς γλυκόζης). Ακόμη πραγματοποιήθηκε σύνθεση δύο πολυλειτουργικών υποστρωμάτων τα οποία φέρουν κατάλληλες λειτουργικές ομάδες ώστε να μπορούν να συνδυαστούν ταυτόχρονα με έναν παράγοντα απεικόνισης, έναν ογκοστοχευτικό παράγοντα και έναν μοριακό ιχνηθέτη. Χρησιμοποιήθηκαν μοριακοί ιχνηθέτες που αλληλοεπιδρούν με βιοθειόλες και το ένζυμο β -γαλακτοσιδάση. Έτσι, συνδυασμός αυτών απέδωσε τα πέντε αυτά μόρια που μελετήθηκαν σε αυτήν την διατριβή. Κοινό χαρακτηριστικό όλων είναι η ανταπόκριση σε μεταβολές του ιξώδους, η οποία επιτεύχθηκε με χρήση δομικών στοιχείων που περιστρέφονται σε χαμηλές τιμές ιξώδους ενώ μειώνουν την περιστροφή τους όταν οι τιμές του ιξώδους αυξάνονται. Αυτό έχει ως συνέπεια τη μεταβολή της έντασης απορρόφησης και εκπομπής των χρωστικών αυτών. Επίσης, ανάλογα με τις ιδιότητες της εκάστοτε χρωστικής τα μόρια μελετήθηκαν και για επιμέρους χαρακτηριστικά τους όπως μεταβολές σε διαφορετικές τιμές πολικότητας και pH, και σε μεταβολές με μόρια που υπερεκφράζονται σε περιβάλλοντα όγκου όπως θειώδη και όξινα θειώδη ανιόντα.

Οι ενδιάμεσες και τελικές ενώσεις καθαρίστηκαν με κατάλληλες τεχνικές όπως η χρωματογραφία στήλης και η HPLC χρωματογραφία ανάστροφης φάσης και ταυτοποιήθηκαν με 1D/2D NMR και φασματομετρία μάζας. Ακολούθησαν πειράματα μέσω φασματοσκοπίας UV-Vis και φθορισμού.

Αναλυτικότερα, η διαγνωστική ένωση **17** που συντέθηκε διαθέτει έναν χρωμοφόρο πυρήνα ημικυανίνης συνδεδεμένη με ένα πολυλειτουργικό υπόστρωμα το οποίο από την μία διαθέτει μια θέση σύνδεσης με τον ογκοστοχευτικό παράγοντα που στοχεύει τους υποδοχείς γλυκόζης- οι οποίοι υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα- και από την άλλη συνδέεται με μία ομάδα πιπεραζίνης. Η

ομάδα αυτή διαθέτει ικανότητα περιστροφής και μπορεί να συνδεθεί με κάποιον άλλο παράγοντα. Εμείς συνδέσαμε μια δραστική ομάδα που αφενός περιορίζει την περιστροφή του πιπεραζινικού δακτυλίου και αφετέρου επιτρέπει, λόγω της παρουσίας ενός ατόμου χλωρίου, την ομοιοπολική σύνδεση με βιομόρια όπως πρωτεΐνες που φέρουν ελεύθερες υδροξυλομάδες και σουλφυδριλομάδες. Δεδομένου ότι η αλληλεπίδραση με βιομόρια θα πρέπει βασικά να έχει ως αποτέλεσμα τον αποκλεισμό των τοπικών μορίων νερού, μειώνοντας έτσι την πολικότητα και αυξάνοντας το ιξώδες του τοπικού μικροπεριβάλλοντος, πραγματοποιήσαμε τα αντίστοιχα πειράματα με φασματοσκοπία υπ-υπ και φθορισμού και παρατηρήσαμε αύξηση του φθορισμού κατά ~26 φορές σε αύξηση του ιξώδους από 100:0 νερό:γλυκερόλη σε 99:1 νερό:γλυκερόλη. Ταυτόχρονα το μόριο αυτό αλληλοεπιδρά με θειώδη και όξινα θειώδη ανιόντα που οδηγούν σε τροποποίηση του μορίου. Αυτό επιβεβαιώθηκε με τιτλοδοτήσεις υπ-υπ και φθορισμού όπου παρατηρήθηκε μείωση του φθορισμού κατά ~12 φορές και με φασματοσκοπία NMR, όπου η μορφή του φάσματος φαίνεται να αλλάζει δραστικά. Τα θειώδη και όξινα θειώδη ανιόντα υπάρχουν στα μιτοχόνδρια των κυττάρων και βρίσκονται σε περίσσεια όταν το ένζυμο οξειδάση θειώδους υπολειτουργεί. Έτσι η χρωστική αυτή εισέρχεται στα καρκινικά κύτταρα μέσω υποδοχών γλυκόζης, έπειτα μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια λόγω της ύπαρξης ενός θετικού φορτίου και καταστρέφεται λόγω της αλληλεπίδρασης με τα θειώδη, με ταυτόχρονη οπτικοποίηση της «διαδρομής» της και αύξηση του φθορισμού όταν συνδέεται με βιομόρια, αφού η σύνδεση με βιομόρια αυξάνει το τοπικό ιξώδες.

Στη συνέχεια, θελήσαμε να χρησιμοποιήσουμε τον νεοσυνθετισμένο φωτοευαίσθητοποιητή που εκτός από την ικανότητα απεικόνισης δίνει την δυνατότητα επιλεκτικής κυτταροτοξικότητας μετά από ακτινοβολήση. Χρησιμοποιώντας μια ομάδα που αφενός περιστρέφεται και αφετέρου διαθέτει ένα άτομο χλωρίου για αλληλεπίδραση με βιομόρια, συνθέσαμε μια σχετικά απλή χρωστική (**ένωση 25**) η οποία απέδωσε εξαιρετικά αποτελέσματα με αύξηση της έντασης του φθορισμού ~**1416** φορές σε μεταβολές του ιξώδους προς τα πάνω (από 100:0 νερό:γλυκερόλη σε 99:1 νερό:γλυκερόλη). Επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση του φθορισμού ~**385** φορές με μείωση της πολικότητας από 100:0 νερό:διοξάνιο σε 90:10 νερό:διοξάνιο. Επίσης, συντέθηκε μία ακόμη χρωστική με τον χρωμοφόρο παράγοντα φλαβυλίου και δομή που ομοιάζει με την προηγούμενη ένωση για ανταπόκριση του ιξώδους (**ένωση 32**). Πιο συγκεκριμένα, η χρωστική αυτή απέδωσε αύξηση του φθορισμού κατά ~**237 φορές** σε μεταβολή του ιξώδους από 100:0 νερό:γλυκερόλη σε 99:1 νερό:γλυκερόλη. Επίσης, φαίνεται να ανταποκρίνεται εξαιρετικά σε μεταβολές του pH, παρουσιάζοντας αύξηση του φθορισμού όσο το pH μειώνεται. Η χρωστική αυτή διαφέρει διαθέτει έναν παράγοντα στόχευσης που περιγράφεται στην βιβλιογραφία για ειδική στόχευση μιτοχονδρίων. Σύγκριση των αποτελεσμάτων αυτών των χρωστικών έδειξε ότι καλύτερη ανταπόκριση στο ιξώδες είχαν οι χρωστικές που έφεραν το σκελετό του άλατος φλαβυλίου. Αυτό πιθανά αποδίδεται στο γεγονός ότι ένας από τους δότες ηλεκτρονίων της χρωστικής είναι μια διαιθυλάμινο ομάδα η οποία περιστρέφεται και πιθανά συμβάλει στο τελικό αποτέλεσμα. Στην ίδια ομάδα πιθανά οφείλεται και η μεταβολή του φθορισμού των ενώσεων όταν το pH μειώνεται. Πρωτονίωση της διαιθυλάμινο ομάδας αλλάζει την φύση της από δότη ηλεκτρονικής πυκνότητας σε δέκτη. Η μεταβολή της έντασης του φθορισμού ή/και της απορρόφησης αποτελεί το έναυσμα για την επιλεκτική ακτινοβολή των κυττάρων στόχων.

Χρησιμοποιώντας το ίδιο φθοροφόρο σκελετό συνδεδεμένο αυτή την φορά με ένα διαφορετικό πολυλειτουργικό υπόστρωμα συνθέσαμε μια χρωστική που στοχεύει τους υποδοχείς βιοτίνης, μέσω των οποίων εισέρχεται στο εσωτερικό των κυττάρων (**ένωση 44**). Έπειτα μέσω του θετικού της φορτίου θα μπορούσε να συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια στα οποία υπερεκφράζονται

βιοθειόλες με τις οποίες αλληλοεπιδρά και το μόριο ιχνηθέτης αυτών απομακρύνεται από την δομή του μορίου μεταβάλλοντας τα φωτοφυσικά χαρακτηριστικά της ένωσης. Αυτό θα μπορούσε να αποτελεί ένδειξη για ακτινοβόληση και θανάτωση των καρκινικών κυττάρων. Επίσης παρουσιάζει εξαιρετικά αποτελέσματα ως προς το ιξώδες με μεταβολή **-315 φορές**, και ως προς την μεταβολή στο pH με αύξηση του φθορισμού **-53 φορές** από αλκαλικό (9.0) σε όξινο (2.7) pH, καθιστώντας την έναν εξαιρετικό ανιχνευτή.

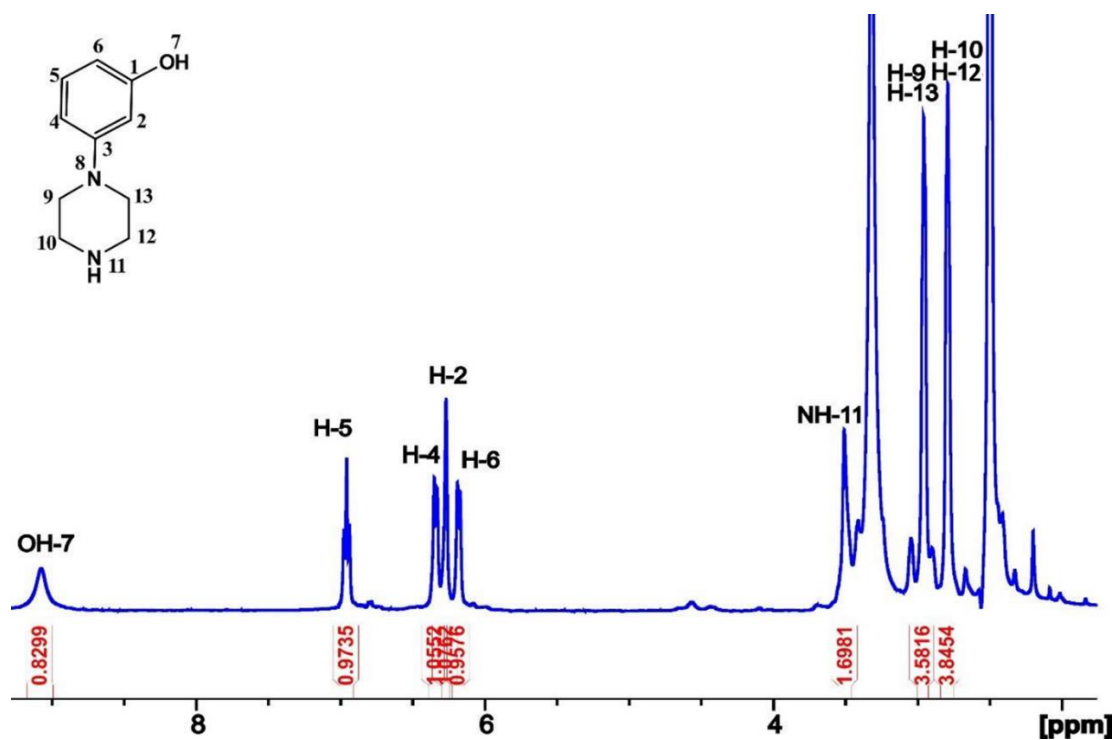
Τέλος, με αφορμή την πρόσφατη ανακάλυψη ότι τα γηρασμένα κύτταρα υποστηρίζουν την ανάπτυξη των όγκων οδηγηθήκαμε στην σύνθεση μιας τελικής χρωστικής (**ένωση 51**) η οποία συσσωρεύεται στα λυσοσώματα των κυττάρων αυτών. Διαθέτει σαν μόριο ιχνηθέτη ένα σάκχαρο που αποτελεί υπόστρωμα για το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση, που υπερκφράζεται στα λυσοσώματα των γηρασμένων κυττάρων. Αλληλεπίδραση με το ένζυμο οδηγεί σε μεταβολές των φωτοφυσικών ιδιοτήτων της ένωσης δίνοντας το έναυσμα για ακτινοβόληση και θανάτωση των κυττάρων στόχων. Η ένωση αυτή επίσης ανταποκρίνεται σε μεταβολή του ιξώδους με εντυπωσιακό τρόπο (**-1128 φορές**) και του pH με αύξηση του φθορισμού **-58 φορές** από αλκαλικό (7.6) σε όξινο (2.8) pH ενώ ταυτόχρονα φαίνεται να είναι η πιο αποτελεσματική ως προς την παραγωγή των κυτταροτοξικών ριζών μονήρους οξυγόνου.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΚΕΙΜΕΝΟΥ – ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

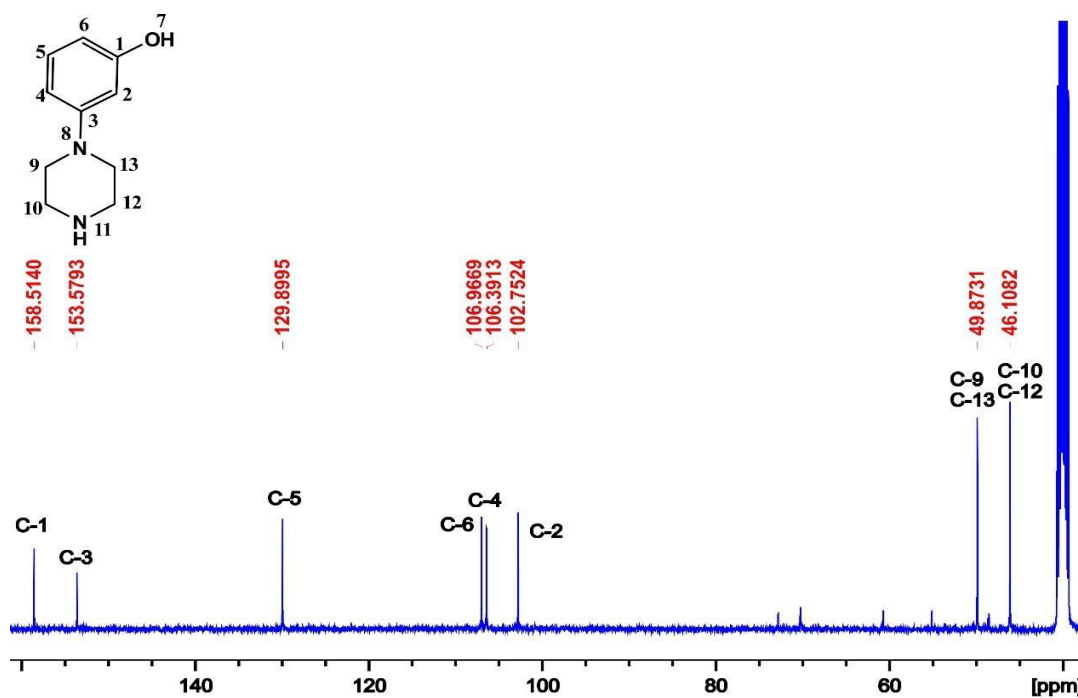
Στο σημείο αυτό του κειμένου παρατίθενται οι χαρακτηρισμοί μέσω φασματοσκοπίας NMR ενώσεων που έχουν πραγματοποιηθεί σε συνεργασία με τον κ. Δημήτρη Διαμαντή. Μελετήθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες και συντέθηκαν ποσότητες σε μεγαλύτερες κλίμακες.

Χαρακτηρισμός της ένωσης 3

Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **3** μέσω φασματοσκοπίας NMR.



^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 9.21-8.90 (br, 1H, OH-7), 7.01-6.91 (t, J = 7.7 Hz, 1H, H-5), 6.39-6.31 (d, J =8.1 Hz, 1H, H-4), 6.26 (s, 1H, H-2), 6.21-6.14 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H-6), 3.54-3.47 (br, NH, H-11), 3.00-2.93 (t, J = 4.1 Hz 4H, H-9 & H-13), 2.84-2.77 (t, J = 3.8 Hz, 4H, H-10 & H-12)

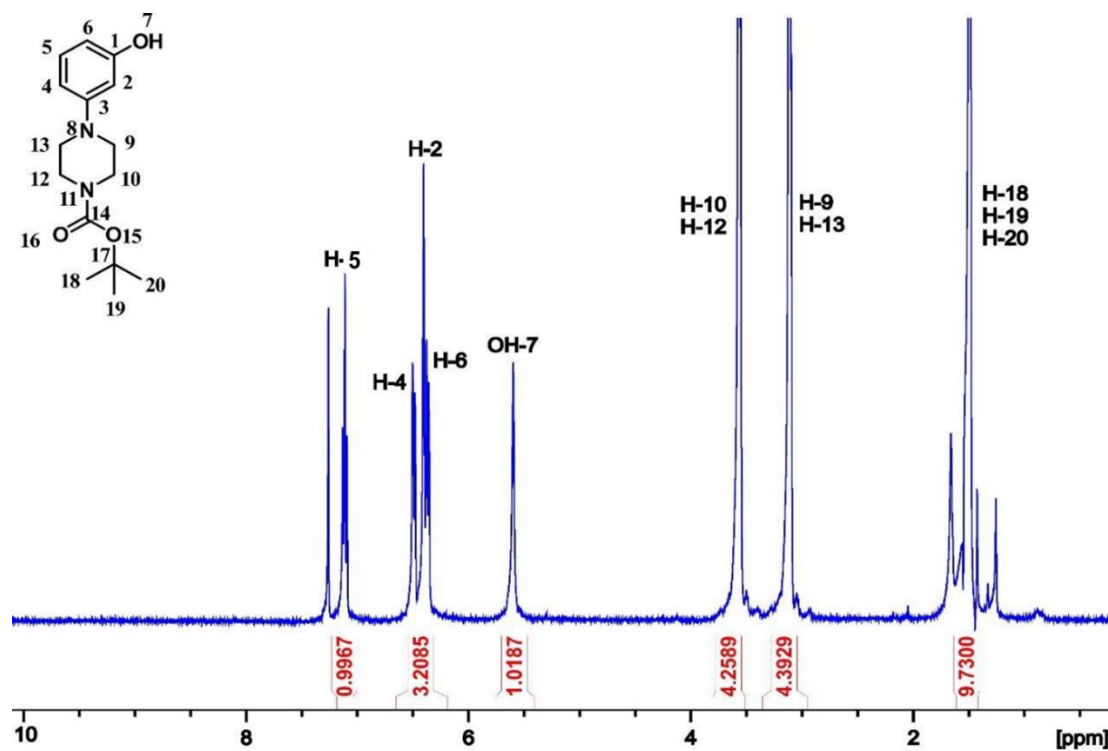


Εικόνα 192: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 3 σε DMSO-d_6 (100 MHz, 25 $^\circ\text{C}$).

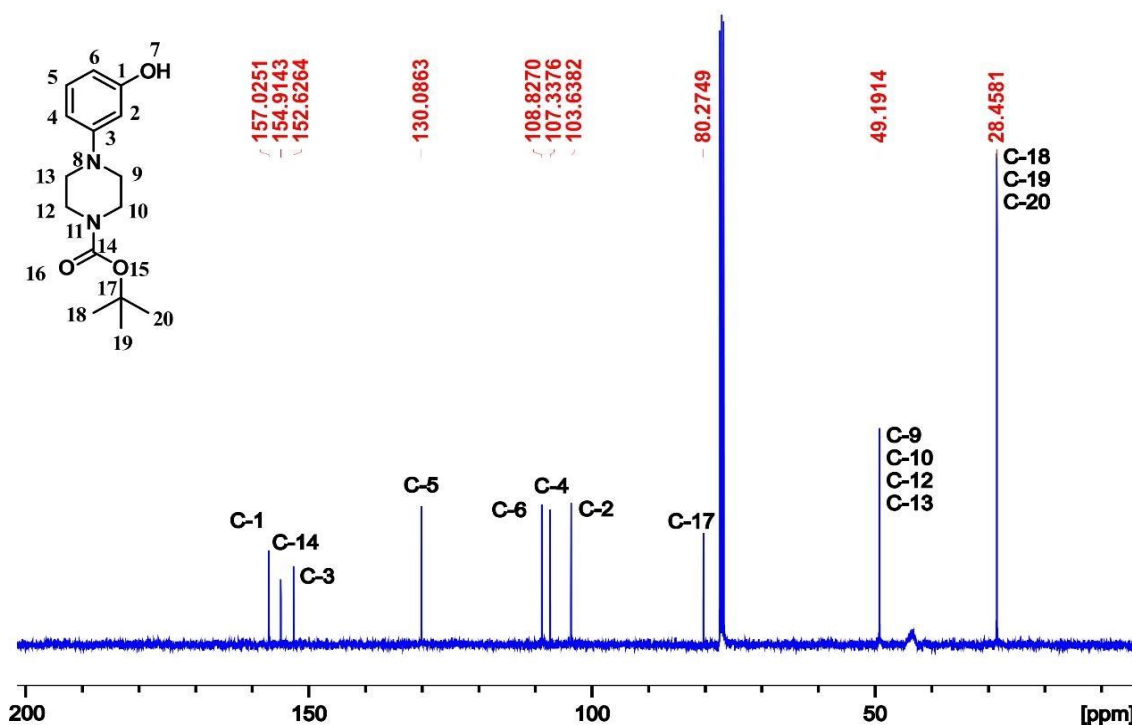
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 158.51 (C-1), 153.58 (C-3), 129.89 (C-5), 106.96 (C-6), 106.39 (C-4), 102.75 (C-2), 49.87 (C-9 & C-13), 47.10 (C-10 & C-12).

Χαρακτηρισμός της ένωσης 4

Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης 4 μέσω φασματοσκοπίας NMR.



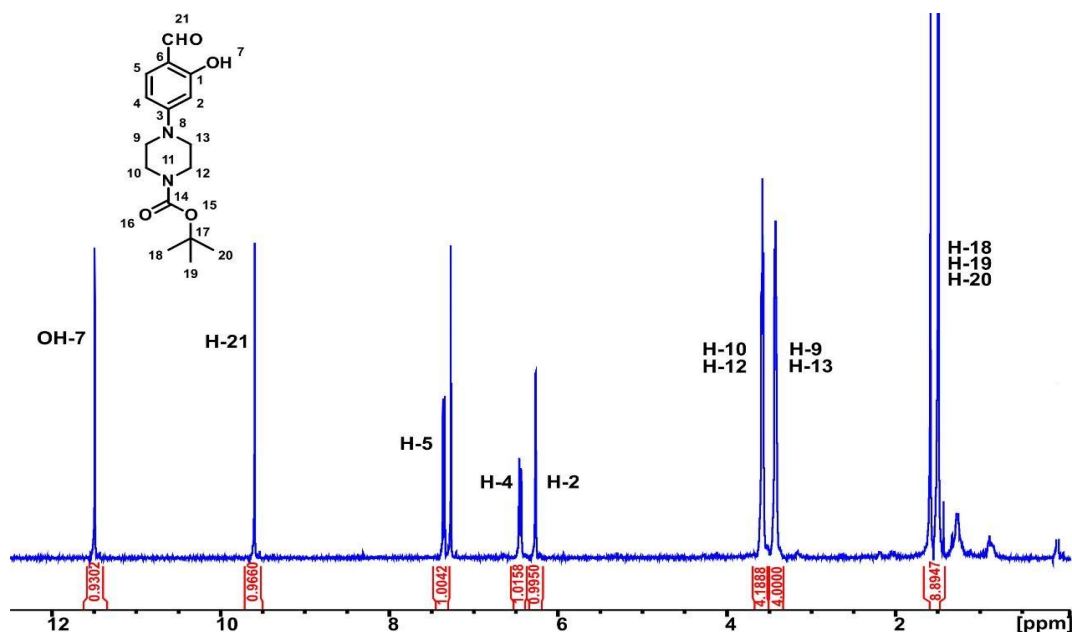
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.15-7.08 (t, J = 8.1 Hz, 1H, H-5), 6.53-6.46 (d, J =8.1 Hz, 1H, H-4), 6.41 (s, 1H, H-2), 6.39-6.35 (d, 7.7 Hz, 1H, H-6), 5.60 (s, 1H, OH-7), 3.63-3.53 (t, J = 5.2 Hz, 4H, H-10 & H-12), 3.14-3.07 (t, J = 5.3 Hz, 4H, H-9 & H-13), 1.51-1.48 (s, 9H, H-18, H-19 & H-20).



^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 157.02 (C-1), 154.91 (C-14), 152.62 (C-3), 130.09 (C-5), 108.82 (C-6), 107.33 (C-4), 103.64 (C-2), 80.27 (C-17), 49.19 (C-9, C-10, C-12 & C-13), 28.44 (C-18, C-19 & C-20).

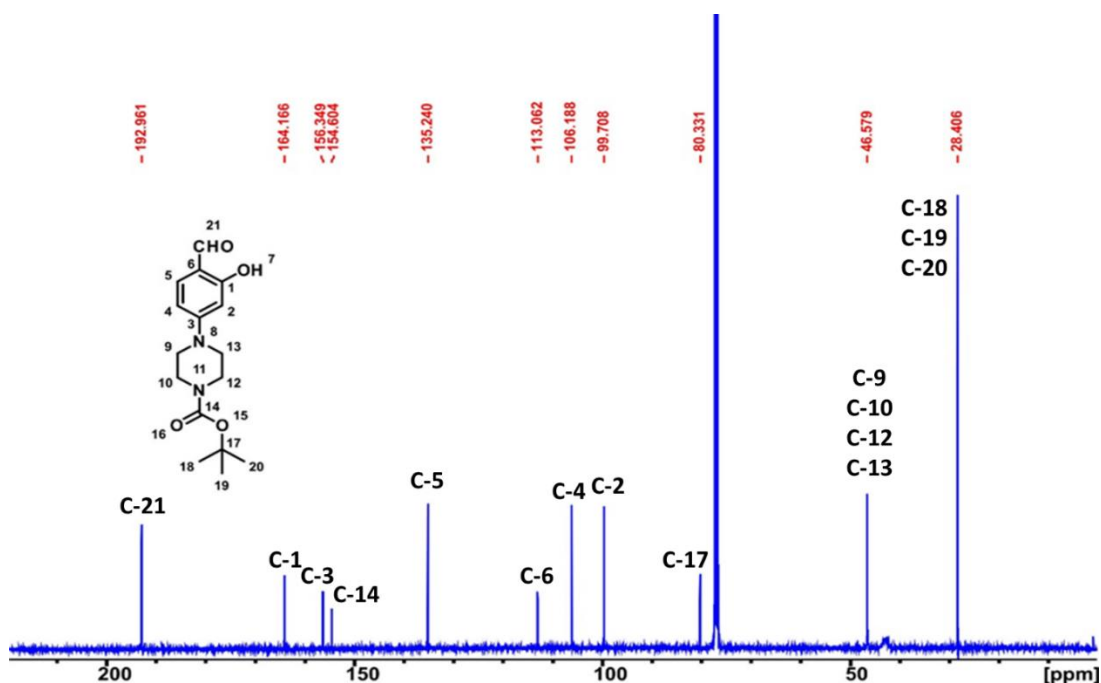
Χαρακτηρισμός της ένωσης 5

Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **5** μέσω φασματοσκοπίας NMR.



Εικόνα 195: Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης **5** σε CDCl₃ (400 MHz, 25 °C).

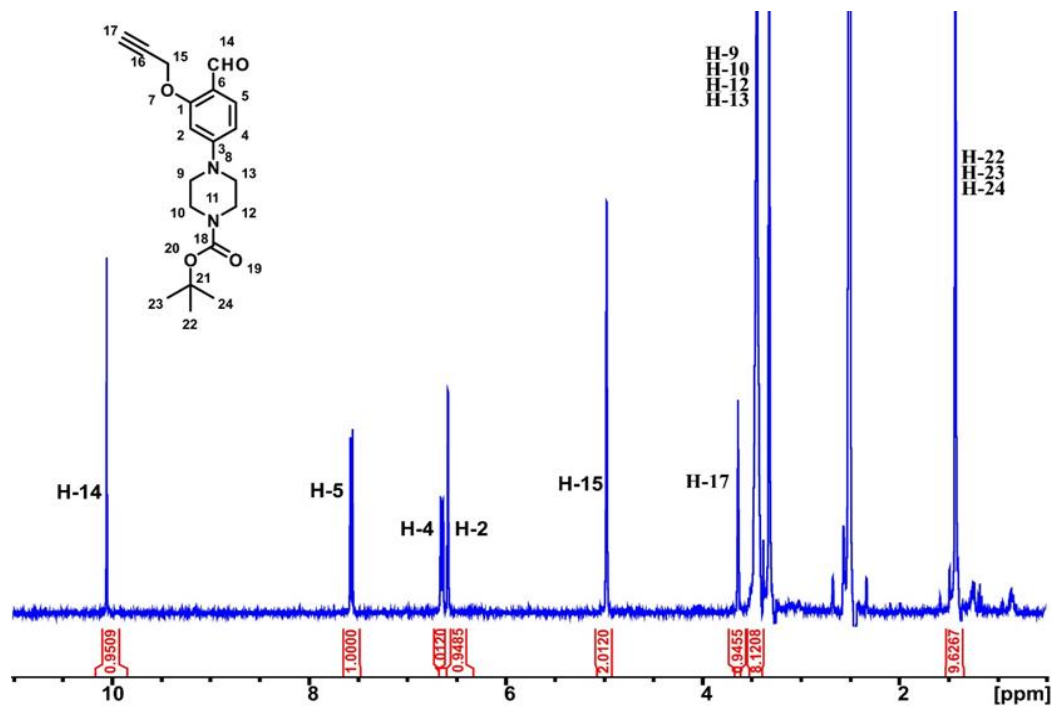
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 11.49 (s, 1H, OH-7), 9.65 (s, 1H, H-21), 7.37-7.33 (d, J=8.7 Hz, 1H, H-5), 6.47-6.42 (dd, J=8.7 Hz & J=2.0 Hz, 1H, H-4), 6.28-6.25 (d, J=2.0 Hz, 1H, H-2), 3.63-3.55 (t, J= 5.6Hz, 4H, H-10 & H-12), 3.46-3.39 (t, J= 5.4 Hz, 4H, H-9 & H-13), 1.50 (s, 9H, H-18, H-19 & H-20).



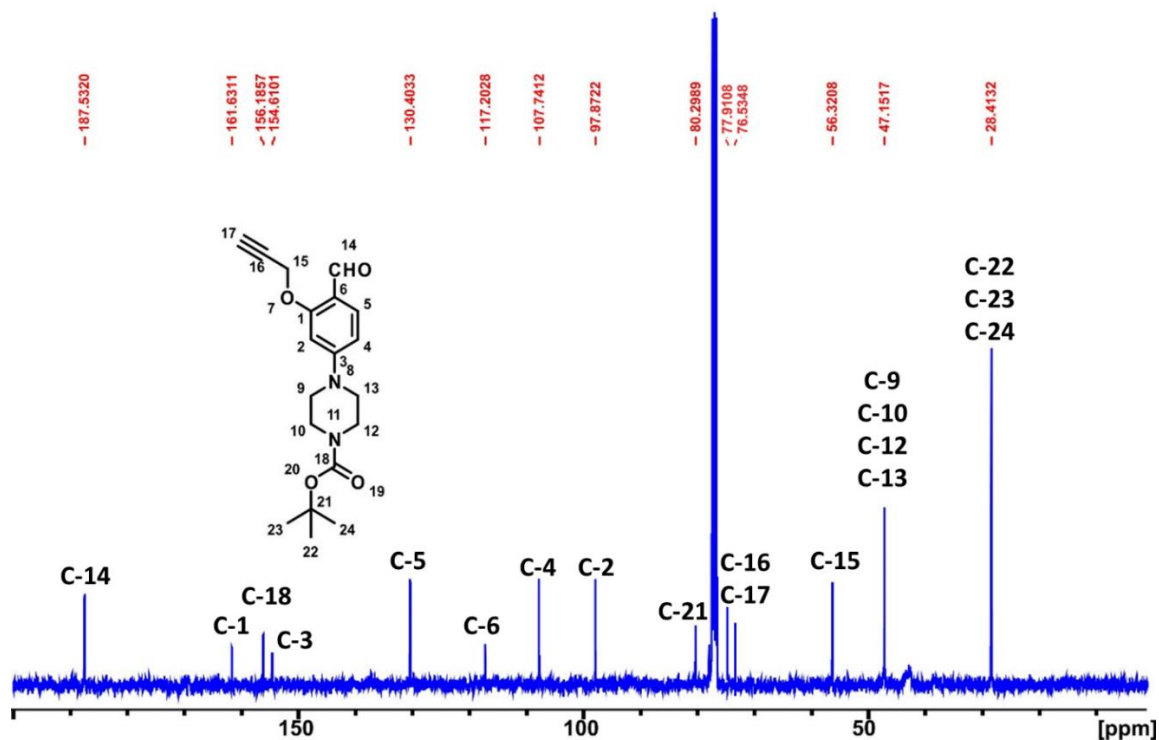
Εικόνα 196: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης **5** σε CDCl₃ (100 MHz, 25 °C).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 192.96 (C-21), 164.16 (C-1), 156.34 (C-3), 154.60 (C-14), 135.25 (C-5), 113.06 (C-6), 106.18 (C-4), 99.70 (C-2), 80.33 (C-17), 46.58 (C-9, C-10, C-12 & C-13), 28.40 (C-18, C-19 & C-20).

Χαρακτηρισμός της ένωσης 6
Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης 6 μέσω φασματοσκοπίας NMR.



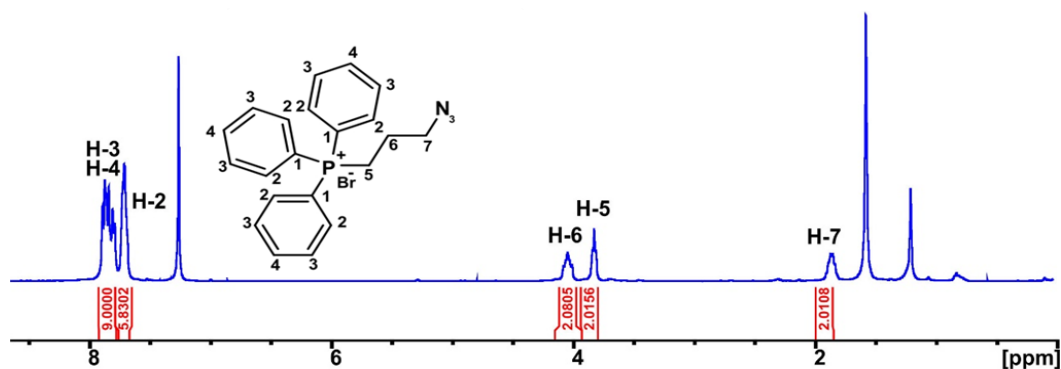
^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 10.05 (s, 1H, H-14), 7.58-7.54 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-5), 6.67-6.62 (d, 8.7 Hz, 1H, H-4), 6.58 (s, 1H, H-2), 4.98 (s, 2H, H-15), 3.65-3.62 (t, J = 2.2 Hz, 1H, H-17), 3.49-3.40 (m, 8H, H-9, H-10, H-12 & H-13), 1.43 (s, 9H, H-22, H-23 & H-24).



^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 187.53 (C-14), 161.63 (C-1), 156.19 (C-18), 154.61 (C-3), 130.40 (C-5), 117.20 (C-6), 107.33 (C-4), 97.87 (C-2), 80.30 (C-21), 77.91 (C-16), 76.53 (C-17), 56.33 (C-15), 47.15 (C-9, C-10, C-12 & C-13), 28.41 (C-22, C-23 & C-24).

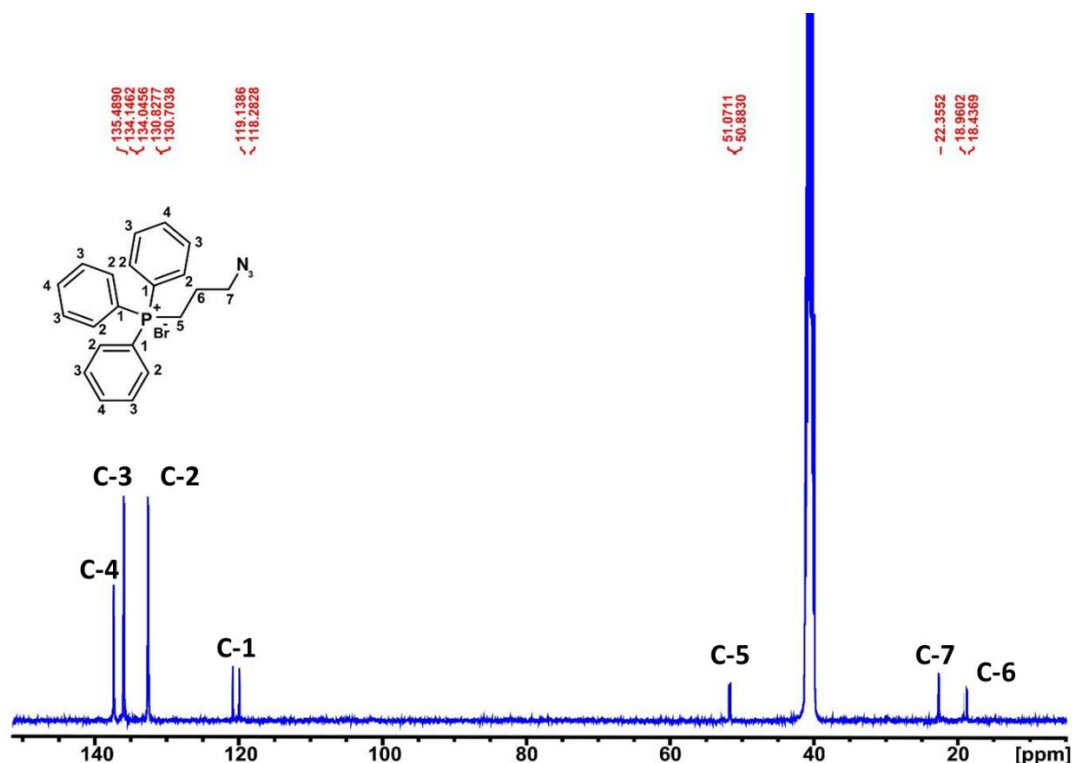
Χαρακτηρισμός της ένωσης 29

Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **29** μέσω φασματοσκοπίας NMR.



Εικόνα 199: Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 29 σε CDCl_3 (400 MHz, 25 °C).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.95-7.78 (m, 9H, H-3 & H-4), 7.76-7.62 (m, 6H, H-2), 3.74-3.58 (m, 2H, H-6), 3.58-3.49 (m, 2H, H-5), 1.86-1.68 (m, 2H, H-7).

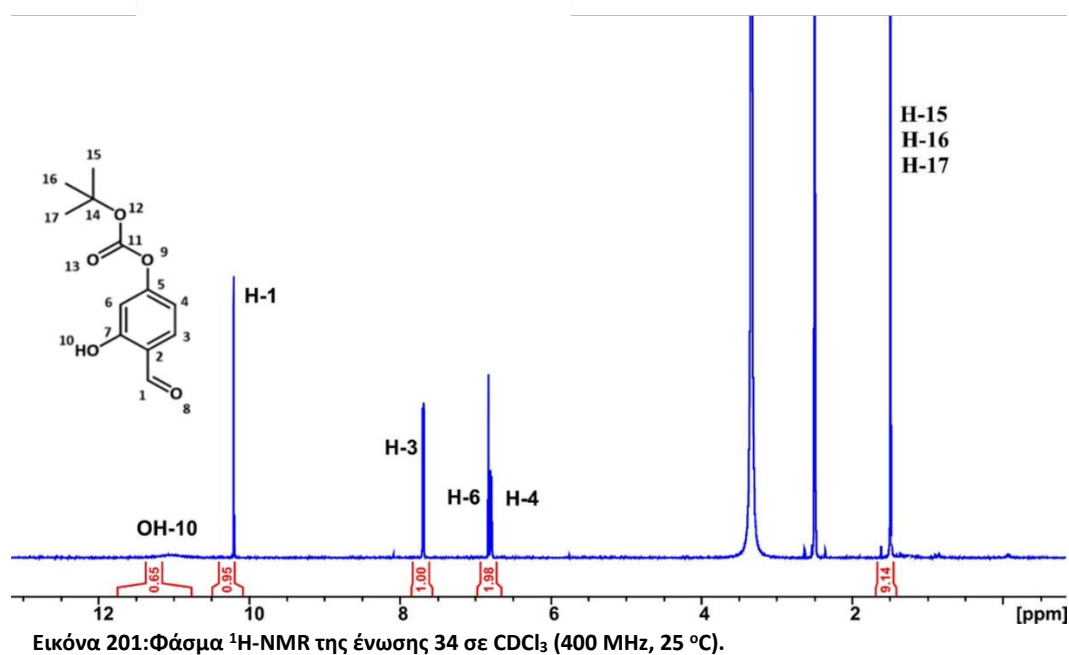


Εικόνα 200: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 29 σε $\text{DMSO}-d_6$ (100 MHz, 25 °C).

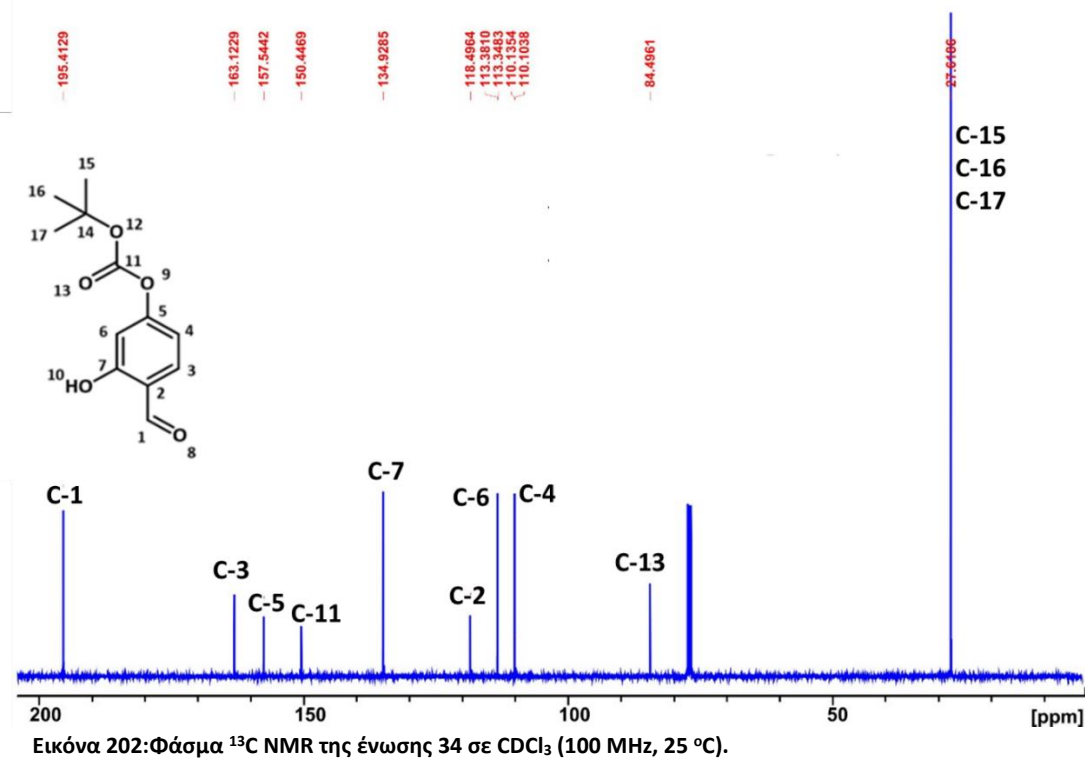
^{13}C NMR (100 Hz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 135.49 (d, $J=2.1$ Hz, C-4), 134.10 (d, $J=10.4$ Hz, C-3), 130.77 (d, $J=12.7$ Hz, C-2), 118.71 (d, $J=86$ Hz, C-1), 50.99 (d, $J=19.4$ Hz, C-5), 22.35 (d, $J=3.1$ Hz, C-7), 18.70 (d, $J=52.8$ Hz, C-6).

Χαρακτηρισμός της ένωσης 34

Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **34** μέσω φασματοσκοπίας NMR.



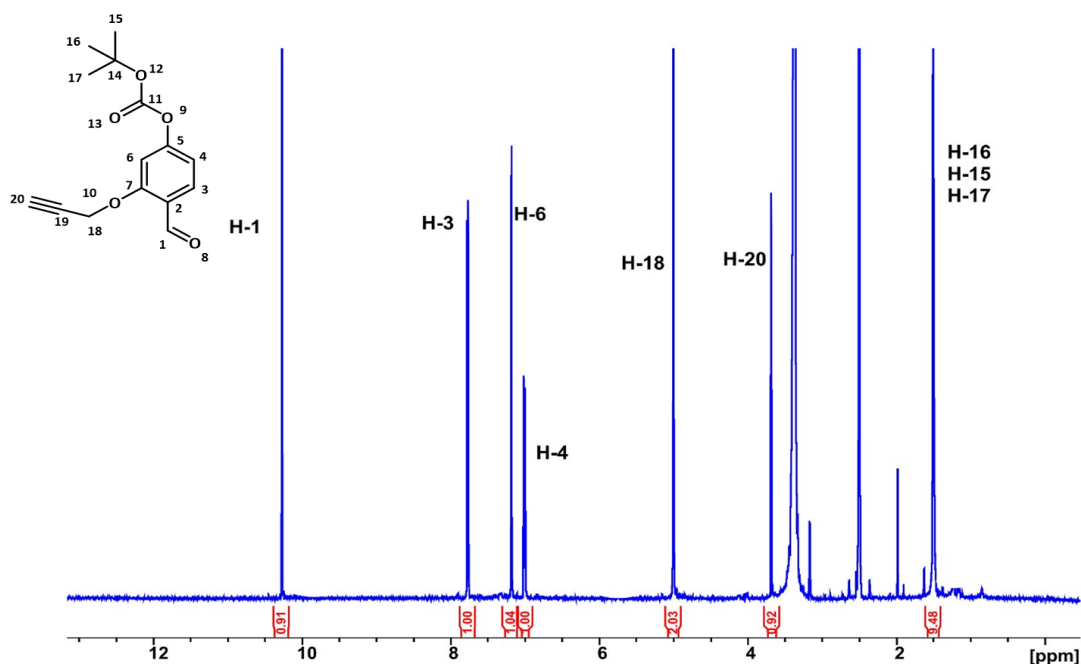
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 11.07 (br, 1H, OH-10), 10.21 (s, 1H, H-1), 7.72-7.68 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-3), 6.84-6.82 (d, J =1.4 Hz, 1H, H-6), 6.82-6.78 (dd, J =1.4 Hz, 8.4 Hz, 1H, H-4), 1.50 (s, 9H, H-15, H-16 & H-17).



^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 195.41 (C-1), 163.12 (C-3), 157.54 (C-5), 150.44 (C-11), 134.92 (C-7), 118.43 (C-2), 113.38 (C-6), 110.12 (C-4), 84.49 (C-13), 27.64 (C-16, C-15 & C-17).

Χαρακτηρισμός της ένωσης 35

Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός της ένωσης μέσω φασματοσκοπίας NMR.

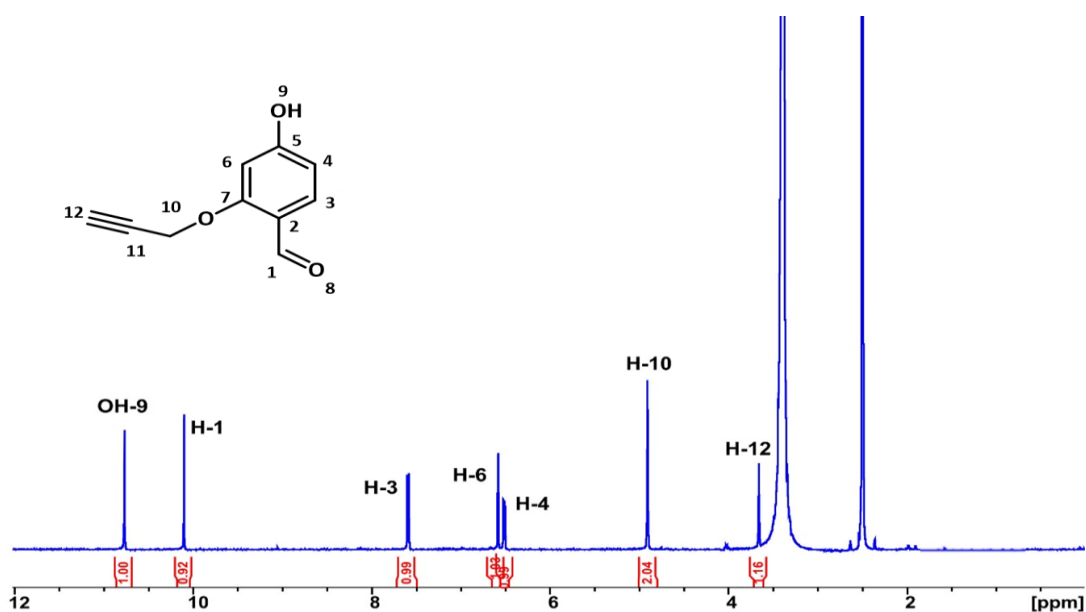


Εικόνα 203:Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης 35 σε DMSO-d₆ (400 MHz, 25 °C).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.27 (s, 1H, H-1), 7.79-7.71 (d, J= 8.4 Hz, 1H, H-3), 7.19-7.17 (d, J=1.4 Hz, 1H, H-6), 7.03-6.98 (dd, J=1.4 Hz, 8.4 Hz, 1H, H-4), 5.01-4.99 (d, J=2.1 Hz, 2H, H-18), 3.69-3.67 (t, J=2 Hz, 1H, H-20), 1.50 (s, 9H, H-17, H-15 & H-16).

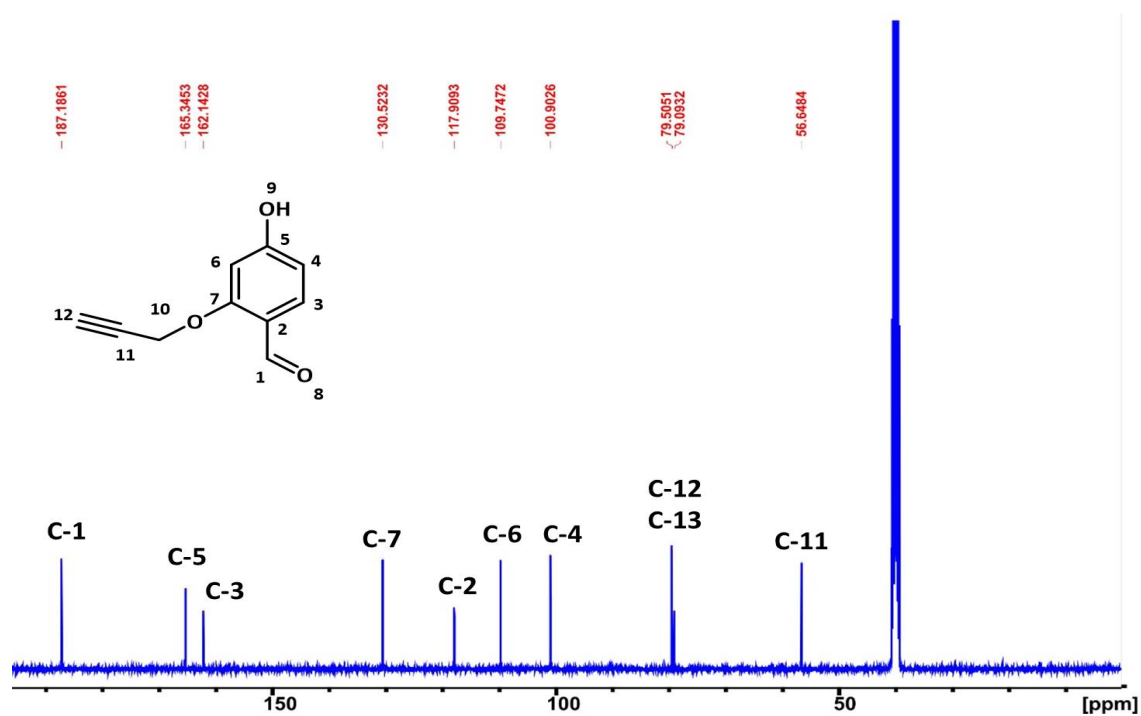
Χαρακτηρισμός της ένωσης 36

Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός της ένωσης 36 μέσω φασματοσκοπίας NMR.



Εικόνα 204:Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης 36 σε DMSO-d₆ (400 MHz, 25 °C).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.77 (s, 1H, OH-9), 10.10 (s, 1H, H-1), 7.61-7.57 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-3), 6.59-5.57 (d, J =1.4 Hz, 1H, H-6), 6.54-6.48 (dd, J =1.4 Hz, 8.4 Hz, 1H, H-4), 4.92-4.90 (d, J =2.1 Hz, 2H, H-10), 3.67-3.64 (t, J =2.1 Hz, 1H, H-12).

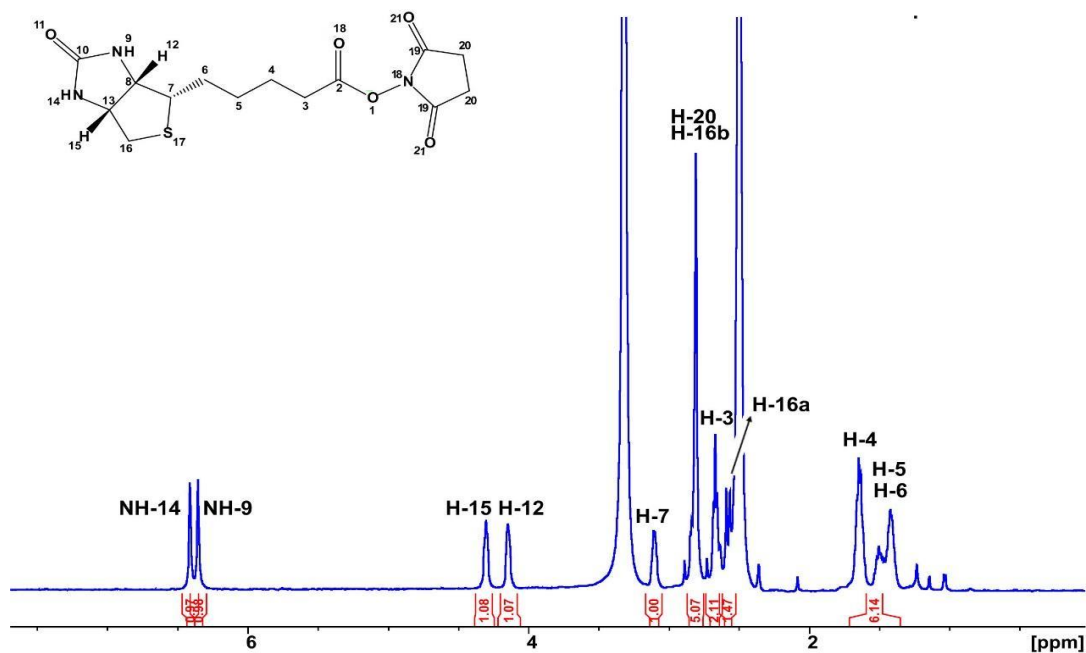


Εικόνα 205: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 36 σε DMSO- d_6 (100 MHz, 25 °C).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 187.18 (C-1), 165.34 (C-5), 162.14 (C-7), 130.52 (C-3), 117.90 (C-2), 109.74 (C-4), 100.90 (C-6), 79.50 (C-11), 79.09 (C-12), 55.65 (C-10).

Χαρακτηρισμός της ένωσης 38

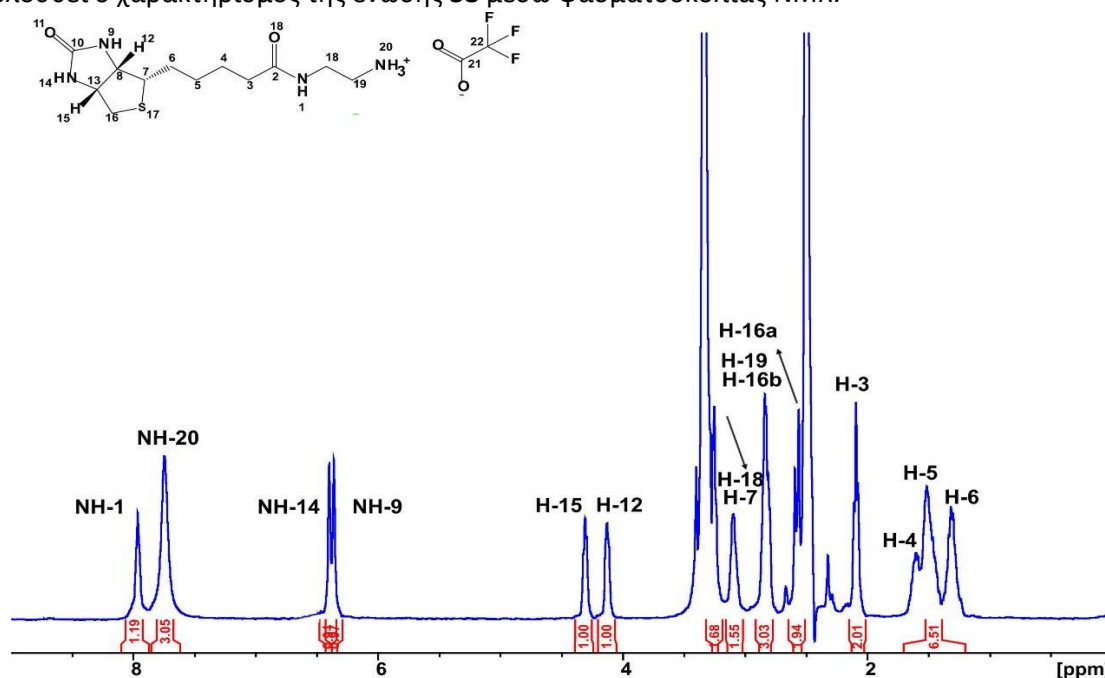
Ακολουθεί το πρωτονιακό του φάσμα NMR.



Εικόνα 206: Φάσμα ^1H -NMR του NHS-εστέρα της ένωσης 37 σε DMSO- d_6 (400 MHz, 25 °C).

^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.42 (s, 1H, NH-14), 6.36 (s, 1H, NH-9), 4.25–4.33 (m, 1H, H-15), 4.18–4.13 (m, 1H, H-12), 3.14–3.07 (m, 1H, H-7), 2.76–2.87 (m, 5H, H-20 & H-16b), 2.69–2.65 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H-3), 2.57–2.53 (m, 1H, H-16a), 1.34–1.70 (m, 6H, H-4, H-5 & H-6).

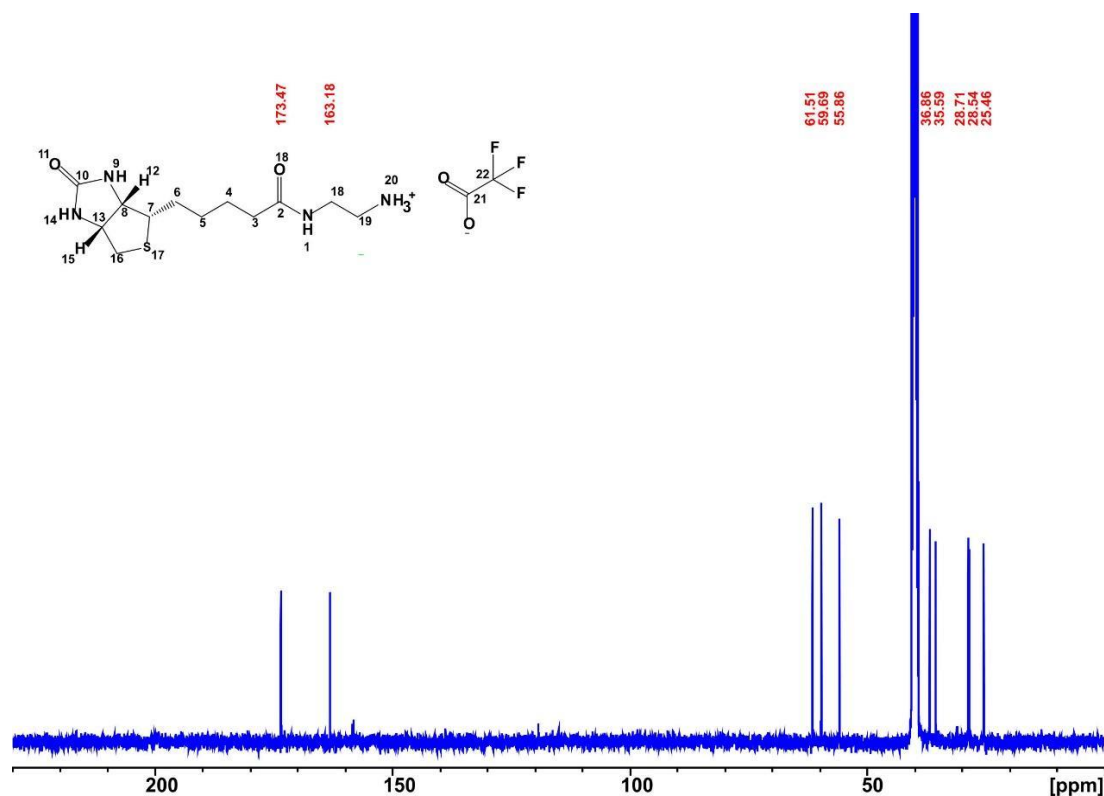
Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός της ένωσης 38 μέσω φασματοσκοπίας NMR.



Εικόνα 207: Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 38 σε DMSO- d_6 (400 MHz, 25 °C).

^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.98–7.94 (t, J = 5 Hz, 1H, NH-1), 7.75 (br, 3H, NH-20), 6.40 (br, 1H, NH-14), 6.36 (br, 1H, NH-9), 4.35–4.27 (m, 1H, H-15), 4.15–4.10 (m, 1H, H-12), 3.28–3.22 (m, 2H, H-

18), 3.14–3.06 (m, 1H, H-7), 2.88–2.78 (m, 3H, H-19 & H-16b), 2.59–2.52 (m, 1H, H-16a), 2.13–2.08 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H-3), 1.20–1.66 (m, 6H, H-4, H-5 & H-6).

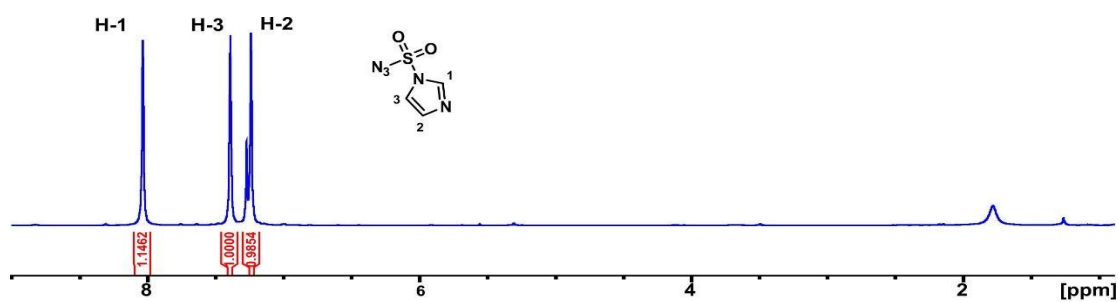


Εικόνα 208: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 38 σε DMSO- d_6 (100 MHz, 25 °C).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 173.47 (C-2), 163.18 (C-10), 61.51 (C-8), 59.69 (C-13), 55.86 (C-7), 40.67 (C-18), 39.23 (C-16), 36.86 (C-9), 35.59 (C-3), 28.71 (C-5), 28.54 (C-4), 25.46 (C-6).

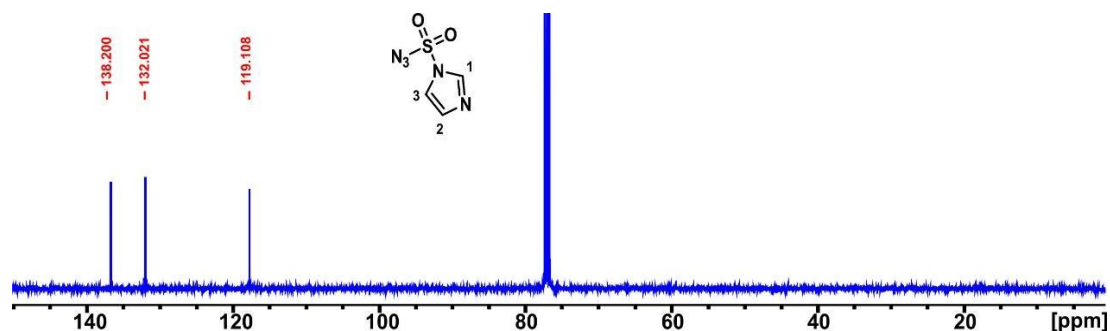
Χαρακτηρισμός της ένωσης 39

Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός της ένωσης 39 μέσω φασματοσκοπίας NMR.



Εικόνα 209: Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 39 σε CDCl_3 (400 MHz, 25 °C).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.07–8.00 (d, J=1.4 Hz, 1H, H-1), 7.41–7.37 (d, J=1.7 Hz, 1H, H-3), 7.26–7.20 (d, J=1.7 Hz, 1H, H-2).

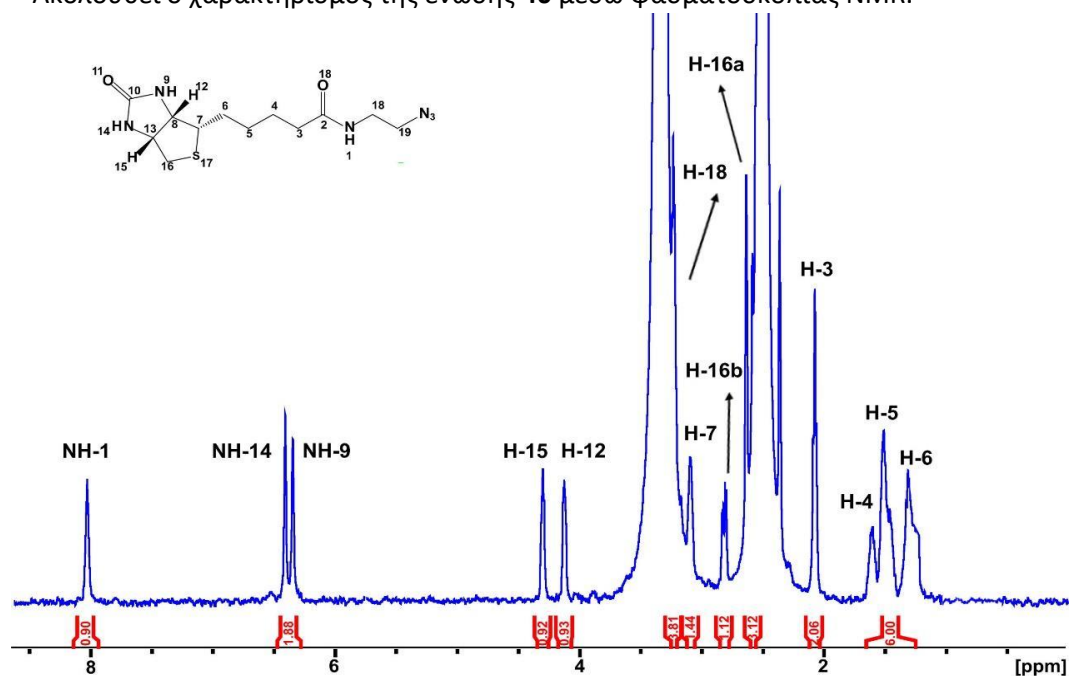


Εικόνα 210: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 39 σε CDCl_3 (100 MHz, 25 °C).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 138.20 (C-1), 132.02 (C-2), 119.10 (C-3).

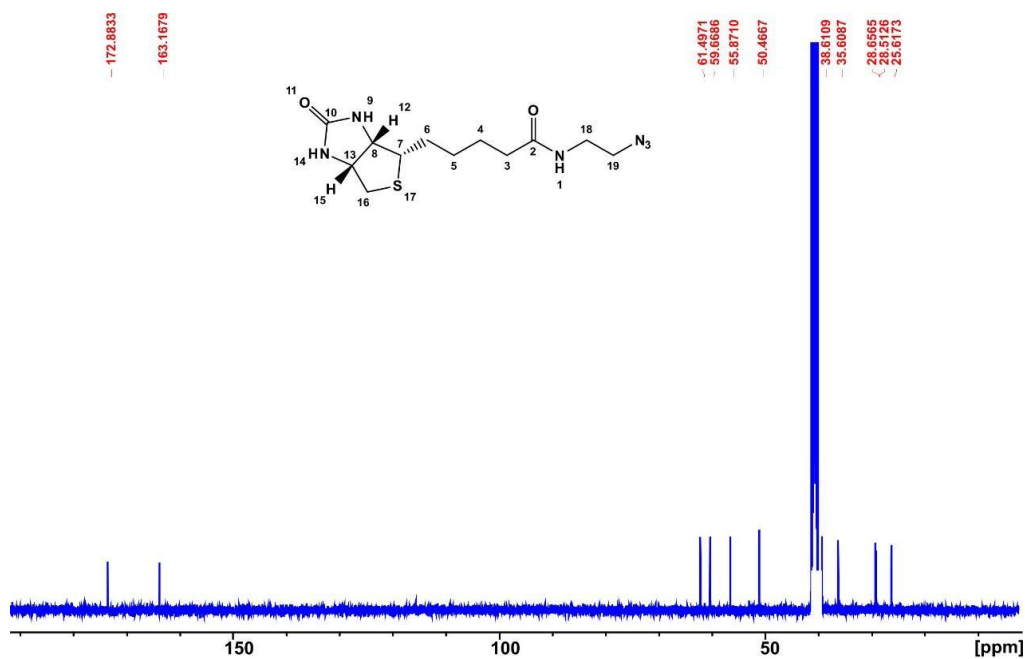
Χαρακτηρισμός της ένωσης 40

Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός της ένωσης 40 μέσω φασματοσκοπίας NMR.



Εικόνα 211: Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 40 σε $\text{DMSO}-d_6$ (400 MHz, 25 °C).

^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.06-8.02 (t, J = 5.49 Hz, 1H, NH-1), 6.40 (s, 1H, NH-14), 6.36 (s, 1H, NH-9), 4.33-4.27 (m, 1H, H-15), 4.15-4.10 (m, 1H, H-12), 3.25-3.19 (m, 2H, H-18), 3.13-3.06 (m, 1H, H-7), 2.85-2.78 (m, 1H, H-16b), 2.59-2.52 (m, 1H, H-16a), 2.09-2.06 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H-3), 1.20-1.66 (m, 6H, H-4, H-5 & H-6).

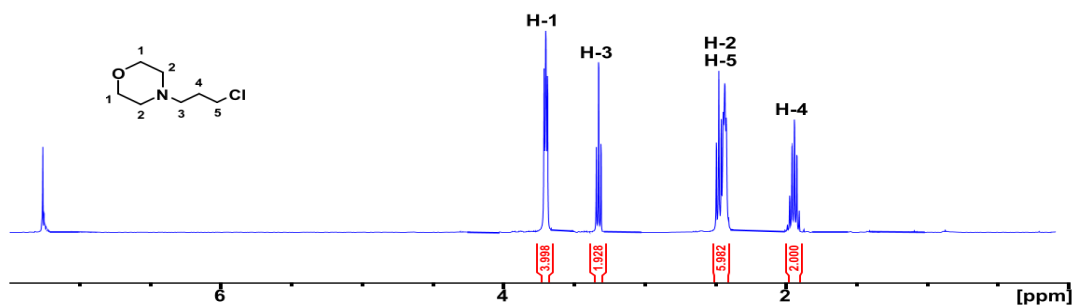


Εικόνα 212: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 40 σε DMSO-d_6 (100 MHz, 25 °C).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ : 172.88 (C-2), 163.16 (C-10), 61.49 (C-8), 59.66 (C-13), 55.87 (C-7), 50.46 (C-19), 40.67 (C-18), 39.23 (C-16), 36.86 (C-9), 35.61 (C-3), 28.65 (C-5), 28.54 (C-4), 25.61 (C-6).

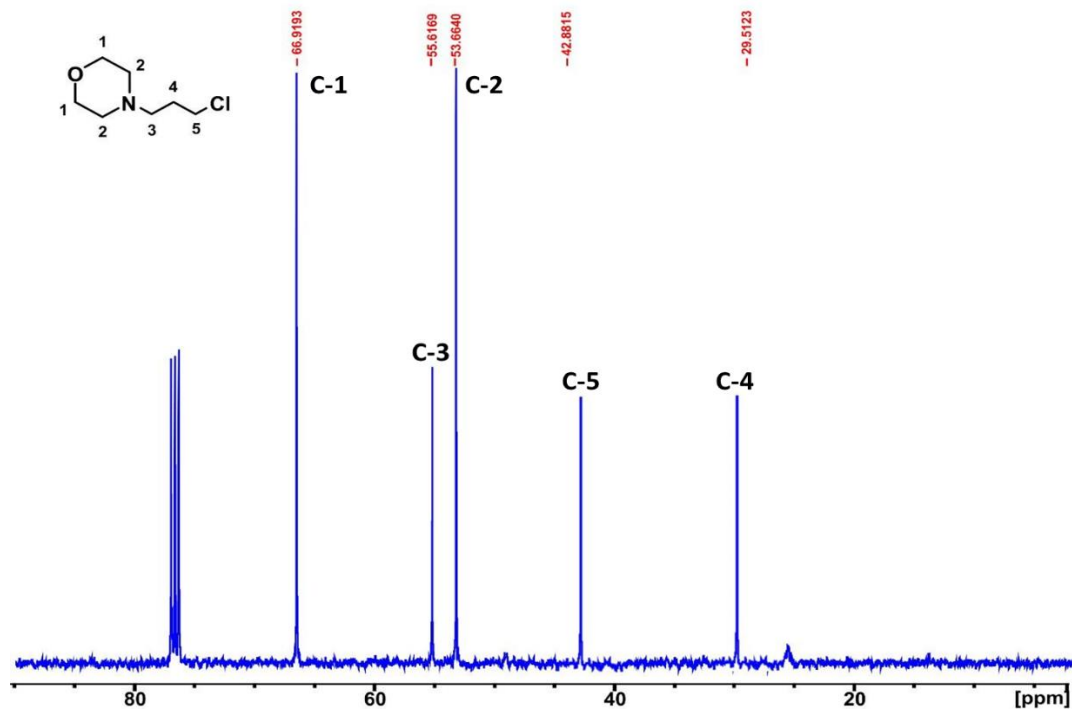
Χαρακτηρισμός της ένωσης 46

Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης 46 μέσω φασματοσκοπίας NMR.



Εικόνα 213: Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 46 σε CDCl_3 (400 MHz, 25 °C).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.72-3.68 (t, $J=4.1$ Hz, 4H, H-1), 3.36-3.30 (t, $J=6.7$ Hz, 2H, H-3), 2.50-2.41 (m, 6H, H-2 & H-5), 1.98-1.90 (q, 2H, H-4).

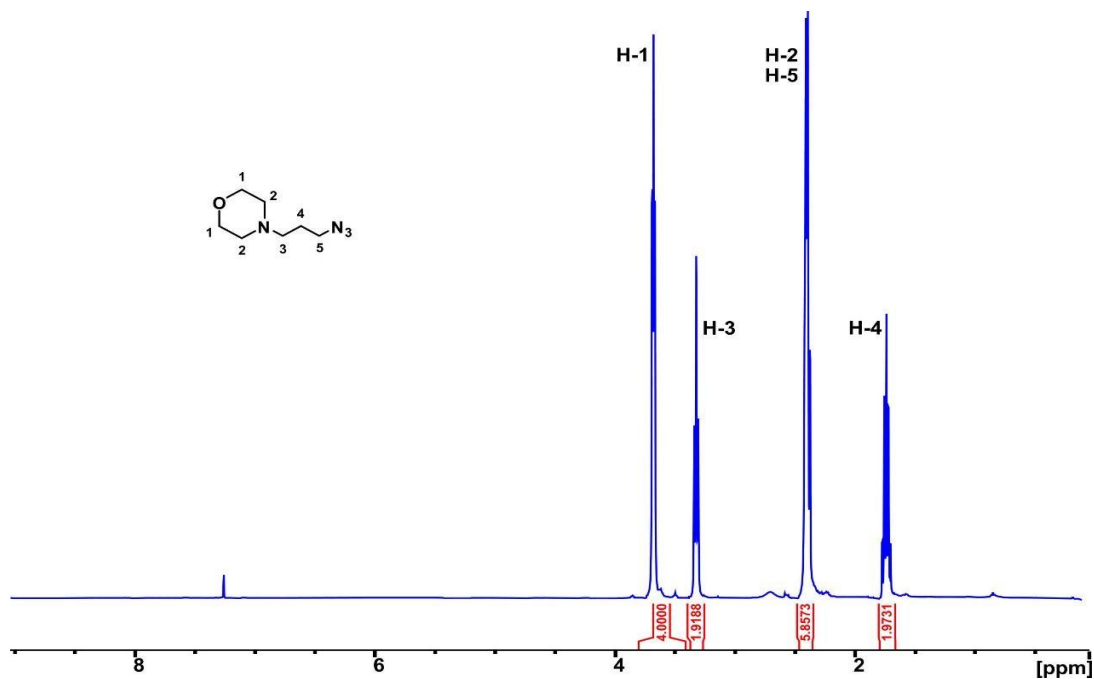


Εικόνα 214: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 46 σε CDCl_3 (100 MHz, 25 °C).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 66.92 (C-1), 55.62 (C-3), 53.66 (C-2), 42.88 (C-5), 29.51 (C-4).

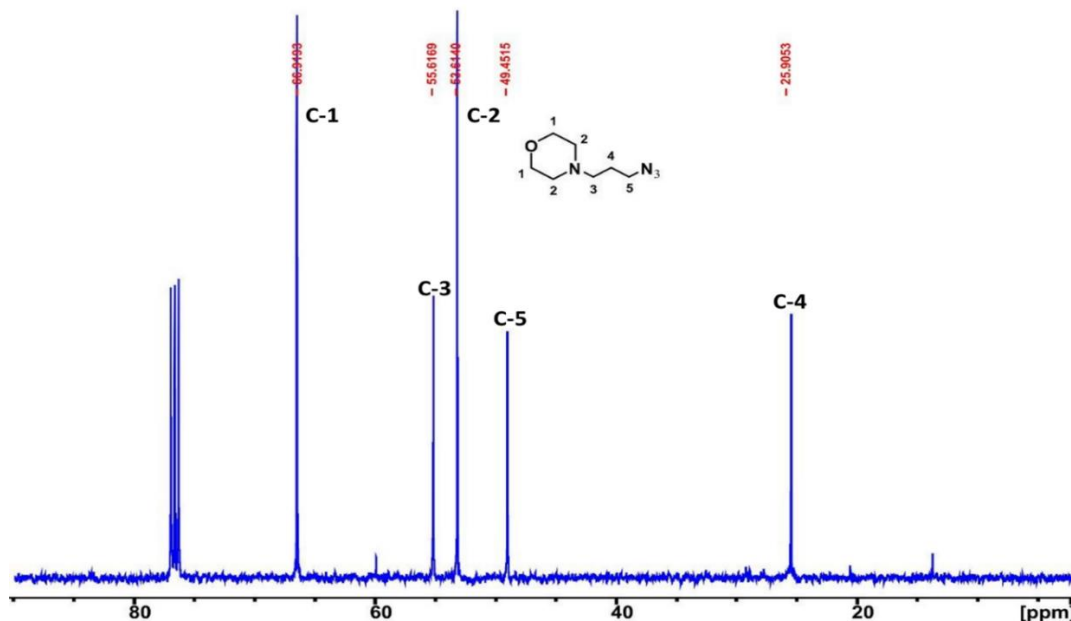
Χαρακτηρισμός της ένωσης 47

Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης **47** μέσω φασματοσκοπίας NMR.



Εικόνα 215: Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 47 σε CDCl_3 (400 MHz, 25 °C).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.71-3.64 (t, $J=4.1$ Hz, 4H, H-1), 3.35-3.30 (t, $J=6.7$ Hz, 2H, H-3), 2.43-2.36 (m, 6H, H-2 & H-5), 1.78-1.69 (q, 2H, H-4).



Εικόνα 216: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 47 σε CDCl_3 (100 MHz, 25 °C).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 66.91(C-1), 55.61 (C-3), 53.61 (C-2), 49.45 (C-5), 25.91 (C-4).

Πειράματα σε μεταβολές του ιξώδους

Προκειμένου να πραγματοποιηθούν τα πειράματα ανταπόκρισης σε μεταβολές του ιξώδους της εκάστοτε ένωσης χρησιμοποιήθηκαν διάφορα δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού και μετρήθηκαν οι τιμές του φθορισμού τους σε τελική συγκέντρωση της ουσίας 10 μM . Τα δεδομένα που λαμβάναμε κάθε φορά χρησιμοποιήθηκαν για να υπολογιστεί η γραμμικότητα της μεταβολής όπως προτείνεται από την βιβλιογραφία [17-23].

Αξίζει να σημειωθεί ότι το φυσιολογικό ιξώδες του πλάσματος του αίματος κυμαίνεται μεταξύ 4 και 6 cP (centipoise) και μπορεί να ξεπεράσει τα 8 cP σε παθολογικές διαταραχές. Σε καρκινικά μικροπεριβάλλοντα έχουν παρατηρηθεί ιξώδη που μπορεί να ξεπερνούν και τα 40 cP στους 37 °C [24]. Οι τιμές αυτές μπορούν να προσομοιωθούν με τα δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού στα οποία πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα, όπως υποδεικνύει και ο παρακάτω πίνακας. Παρατηρούμε ότι σε θερμοκρασία 30 °C το σύστημα 80% γλυκερόλη - 20% νερό μπορεί να περιγράψει μια αντιπροσωπευτική τιμή κοντά στο ιξώδες του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος.

Glyc. % Wt.	Temperature (°C)										
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
0*	1.792	1.308	1.005	0.8007	0.6560	0.5494	0.4688	0.4061	0.3565	0.3165	0.2838
10	2.44	1.74	1.31	1.03	0.826	0.680	0.575	0.500	—	—	—
20	3.44	2.41	1.76	1.35	1.07	0.879	0.731	0.635	—	—	—
30	5.14	3.49	2.50	1.87	1.46	1.16	0.956	0.816	0.690	—	—
40	8.25	5.37	3.72	2.72	2.07	1.62	1.30	1.09	0.918	0.763	0.668
50	14.6	9.01	6.00	4.21	3.10	2.37	1.86	1.53	1.25	1.05	0.910
60	29.9	17.4	10.8	7.19	5.08	3.78	2.85	2.29	1.84	1.52	1.28
65	45.7	25.3	15.2	9.85	6.80	4.89	3.66	2.91	2.28	1.86	1.55
67	55.5	29.9	17.7	11.3	7.73	5.50	4.09	3.23	2.50	2.03	1.68
70	76	38.8	22.5	14.1	9.40	6.61	4.86	3.78	2.90	2.34	1.93
75	132	65.2	35.5	21.2	13.6	9.25	6.61	5.01	3.80	3.00	2.43
80	255	116	60.1	33.9	20.8	13.6	9.42	6.94	5.13	4.03	3.18
85	540	223	109	58	33.5	21.2	14.2	10.0	7.28	5.52	4.24
90	1310	498	219	109	60.0	35.5	22.5	15.5	11.0	7.93	6.00
91	1590	592	259	127	68.1	39.8	25.1	17.1	11.9	8.62	6.40
92	1950	729	310	147	78.3	44.8	28.0	19.0	13.1	9.46	6.82
93	2400	860	367	172	89	51.5	31.6	21.2	14.4	10.3	7.54
94	2930	1040	437	202	105	58.4	35.4	23.6	15.8	11.2	8.19
95	3690	1270	523	237	121	67.0	39.9	26.4	17.5	12.4	9.08
96	4600	1580	624	281	142	77.8	45.4	29.7	19.6	13.6	10.1
97	5770	1950	765	340	166	88.9	51.9	33.6	21.9	15.1	10.9
98	7370	2460	939	409	196	104	59.8	38.5	24.8	17.0	12.2
99	9420	3090	1150	500	235	122	69.1	43.6	27.8	19.0	13.3
100	12070	3900	1410	612	284	142	81.3	50.6	31.9	21.3	14.8

* Viscosity of water taken from "Properties of Ordinary Water-Substances," N. E. Dorsey, p. 184, New York (1940)

Εικόνα 217: Τιμές ιξώδους των δυαδικών συστημάτων γλυκερόλης/νερού σε centipoise, στις διάφορες θερμοκρασίες [25].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1029-1033.
- Hanahan, D., *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. Cancer Discovery, 2022. **12**(1): p. 31-46.
- National Cancer institute. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>.
- World Health Organization. <https://www.who.int/>.
- National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
- Cancer cell and normal cell. Healthy tissue and Malignant tumour. illustration showing cancer disease development. Vector diagram for your design, educational, biological, science and medical use <https://www.dreamstime.com/cancer-cell-normal-healthy-tissue-malignant-tumour-illustration-showing-disease-development-vector-diagram-your-design-image135725846>.
- Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
- Ouyang, L., et al., *Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis*. Cell Proliferation, 2012. **45**(6): p. 487-498.
- Aging process. A telomere located at the ends of chromosomes. Each time a cell divides, the telomeres become shorter. vector for medical, educational, biological and science use. <https://www.dreamstime.com/aging-process-telomeres-shorten-cell-division-stops-telomere-located-ends-chromosomes-each-time-divides-become-image138563335>.
- Cancer Development. Cancerous cells do not submit to senescence or apoptosis. Continuous division of cells that take over healthy cells. Vector diagram for your design, educational, science and medical use. <https://www.dreamstime.com/cancer-development-cancerous-cells-do-not-submit-to-senescence-apoptosis-C3%B1%C2%81ontinuous-division-take-over-healthy-vector-image123482796>.
- Lyssiotis, C.A. and A.C. Kimmelman, *Metabolic Interactions in the Tumor Microenvironment*. Trends in Cell Biology, 2017. **27**(11): p. 863-875.
- Stroo, E., et al., *Cellular Regulation of Amyloid Formation in Aging and Disease*. Frontiers in Neuroscience, 2017. **11**.

13. Bhatia-Dey, N., et al., *Cellular Senescence as the Causal Nexus of Aging*. Frontiers in Genetics, 2016. **7**.
14. Chambers, C.R., et al., *Overcoming the senescence-associated secretory phenotype (SASP): a complex mechanism of resistance in the treatment of cancer*. Molecular Oncology, 2021. **15**(12): p. 3242-3255.
15. Liotta, L.A. and E.C. Kohn, *The microenvironment of the tumour–host interface*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 375-379.
16. Terry, S., S. Buart, and S. Chouaib, *Hypoxic Stress-Induced Tumor and Immune Plasticity, Suppression, and Impact on Tumor Heterogeneity*. Frontiers in Immunology, 2017. **8**.
17. Yeom, C.J., et al., *Microenvironments and Cellular Characteristics in the Micro Tumor Cords of Malignant Solid Tumors*. International Journal of Molecular Sciences, 2012. **13**(11): p. 13949-13965.
18. Shi, Z., Q. Li, and L. Mei, *pH-Sensitive nanoscale materials as robust drug delivery systems for cancer therapy*. Chinese Chemical Letters, 2020. **31**(6): p. 1345-1356.
19. Schieber, M. and N.S. Chandel, *ROS function in redox signaling and oxidative stress*. Curr Biol, 2014. **24**(10): p. R453-62.
20. Chen, X., et al., *Recent progress in the development of fluorescent, luminescent and colorimetric probes for detection of reactive oxygen and nitrogen species*. Chemical Society Reviews, 2016. **45**(10): p. 2976-3016.
21. Wu, G., et al., *Glutathione Metabolism and Its Implications for Health*. The Journal of Nutrition, 2004. **134**(3): p. 489-492.
22. Kennedy, L., et al., *Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies*. Biomolecules, 2020. **10**(10): p. 1429.
23. Liou, G.-Y. and P. Storz, *Reactive oxygen species in cancer*. Free Radical Research, 2010. **44**(5): p. 479-496.
24. Tian, M., Y. Liu, and F.-L. Jiang, *On the Route to Quantitative Detection and Real-Time Monitoring of Glutathione in Living Cells by Reversible Fluorescent Probes*. Analytical Chemistry, 2020. **92**(21): p. 14285-14291.
25. Bugaenko, D.I., et al., *Fluorescent probes on the basis of coumarin derivatives for determining biogenic thiols and thiophenols*. Chemistry of Heterocyclic Compounds, 2019. **55**(6): p. 483-489.
26. Sawayama, H., et al., *Clinical impact of the Warburg effect in gastrointestinal cancer (Review)*. Int J Oncol, 2014. **45**(4): p. 1345-1354.
27. Maiti, B.K., *Cross-talk Between (Hydrogen)Sulfite and Metalloproteins: Impact on Human Health*. Chemistry – A European Journal, 2022. **28**(23): p. e202104342.
28. YANO, Y., et al., *Sulfite Oxidase Is a Novel Prognostic Biomarker of Advanced Gastric Cancer*. In Vivo, 2021. **35**(1): p. 229-237.
29. Zhang, W., et al., *Employing an ICT-FRET Integration Platform for the Real-Time Tracking of SO₂ Metabolism in Cancer Cells and Tumor Models*. Journal of the American Chemical Society, 2020. **142**(13): p. 6324-6331.
30. Yang, X., et al., *Biological applications of a turn-on bioluminescent probe for monitoring sulfite oxidase deficiency in vivo*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2020. **200**: p. 112476.
31. Juers, D.H., B.W. Matthews, and R.E. Huber, *LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance*. Protein Science, 2012. **21**(12): p. 1792-1807.
32. Zhang, J., P. Cheng, and K. Pu, *Recent Advances of Molecular Optical Probes in Imaging of β -Galactosidase*. Bioconjugate Chemistry, 2019. **30**(8): p. 2089-2101.
33. Li, M., M. Yang, and W.-H. Zhu, *Advances in fluorescent sensors for β -galactosidase*. Materials Chemistry Frontiers, 2021. **5**(2): p. 763-774.
34. Zeng, Q., Y. Wu, and T. Zhang, *Photoacoustic nanoprobe for β -galactosidase activity detection and imaging in vivo*. Journal of Innovative Optical Health Sciences, 2019. **12**(03): p. 1941001.

35. Lozano-Torres, B., et al., *Chromo-fluorogenic probes for β -galactosidase detection*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2021. **413**(9): p. 2361-2388.
36. Brennan, M. and B. Lim, *The Actual Role of Receptors as Cancer Markers, Biochemical and Clinical Aspects: Receptors in Breast Cancer*, in *Advances in Cancer Biomarkers: From biochemistry to clinic for a critical revision*, R. Scatena, Editor. 2015, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 327-337.
37. *Receptor-mediated endocytosis includes membrane proteins called receptors that bind specific molecules ligands*. <https://www.dreamstime.com/receptor-mediated-endocytosis-includes-membrane-proteins-called-receptors-bind-specific-molecules-ligands-image152842803>.
38. Louten, J., *Chapter 4 - Virus Replication*, in *Essential Human Virology*, J. Louten, Editor. 2016, Academic Press: Boston. p. 49-70.
39. Russell-Jones, G., et al., *Vitamin-mediated targeting as a potential mechanism to increase drug uptake by tumours*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2004. **98**(10): p. 1625-1633.
40. Fam, K.T., M. Collot, and A.S. Klymchenko, *Probing biotin receptors in cancer cells with rationally designed fluorogenic squaraine dimers*. Chemical Science, 2020. **11**(31): p. 8240-8248.
41. Zhang, Y., et al., *The development of a biotin-guided and mitochondria-targeting fluorescent probe for detecting SO₂ precisely in cancer cells*. Talanta, 2021. **225**: p. 121992.
42. Bhuniya, S., et al., *A fluorescence off-on reporter for real time monitoring of gemcitabine delivery to the cancer cells*. Chemical Communications, 2013. **49**(64): p. 7141-7143.
43. Diamantis, D.A., et al., *Biotin-Yellow a biotin guided NIR turn-on fluorescent probe for cancer targeted diagnosis*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2021. **337**: p. 129807.
44. Ren, W.X., et al., *Recent development of biotin conjugation in biological imaging, sensing, and target delivery*. Chemical Communications, 2015. **51**(52): p. 10403-10418.
45. Navale, A.M. and A.N. Paranjape, *Glucose transporters: physiological and pathological roles*. Biophys Rev, 2016. **8**(1): p. 5-9.
46. Sung, Y.-S., et al., *Aroylhydrazone Glycoconjugate Prochelators Exploit Glucose Transporter 1 (GLUT1) to Target Iron in Cancer Cells*. ACS Medicinal Chemistry Letters, 2022. **13**(9): p. 1452-1458.
47. Hossain, F. and P.R. Andreana, *Developments in Carbohydrate-Based Cancer Therapeutics*. Pharmaceuticals, 2019. **12**(2): p. 84.
48. Du, W., et al., *Mitochondria-specific two-photon fluorogenic probe for simultaneously visualizing nitroreductase and viscosity in cancer cells*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2022. **370**: p. 132456.
49. Wu, Y., et al., *Mitochondrial-Targeting Near-Infrared Fluorescent Probe for Visualizing Viscosity in Drug-Induced Cells and a Fatty Liver Mouse Model*. Analytical Chemistry, 2022. **94**(12): p. 5069-5074.
50. *Cancer cells exposed to high viscosity move better and their metastatic potential increases*. Cancer cells exposed to high viscosity move better and their metastatic potential increases November 2, 2022; Available from: <https://www.sciencedaily.com/releases/2022/11/221102135646.htm>.
51. Yin, J., X. Kong, and W. Lin, *Noninvasive Cancer Diagnosis In Vivo Based on a Viscosity-Activated Near-Infrared Fluorescent Probe*. Analytical Chemistry, 2021. **93**(4): p. 2072-2081.
52. Bera, K., et al., *Extracellular fluid viscosity enhances cell migration and cancer dissemination*. Nature, 2022. **611**(7935): p. 365-373.
53. Strzyz, P., *The memory of viscosity*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2022.
54. Kuimova, M.K., *Mapping viscosity in cells using molecular rotors*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2012. **14**(37): p. 12671-12686.
55. Miao, W., et al., *Functionalized BODIPYs as Fluorescent Molecular Rotors for Viscosity Detection*. Frontiers in Chemistry, 2019. **7**.

56. Liu, T., et al., *Quantitatively Mapping Cellular Viscosity with Detailed Organelle Information via a Designed PET Fluorescent Probe*. Scientific Reports, 2014. **4**(1): p. 5418.
57. Xiao, H., P. Li, and B. Tang, *Small Molecular Fluorescent Probes for Imaging of Viscosity in Living Biosystems*. Chemistry – A European Journal, 2021. **27**(23): p. 6880-6898.
58. Yang, X., et al., *Recent advances in multifunctional fluorescent probes for viscosity and analytes*. Coordination Chemistry Reviews, 2022. **453**: p. 214336.
59. Halaoui, R. and L. McCaffrey, *Rewiring cell polarity signaling in cancer*. Oncogene, 2015. **34**(8): p. 939-950.
60. Zou, G., et al., *A ratiometric fluorescent probe based on carbon dots assembly for intracellular lysosomal polarity imaging with wide range response*. Chinese Chemical Letters, 2022. **33**(2): p. 778-782.
61. Xiao, H., P. Li, and B. Tang, *Recent progresses in fluorescent probes for detection of polarity*. Coordination Chemistry Reviews, 2021. **427**: p. 213582.
62. Qin, X., et al., *Polarity-based fluorescence probes: properties and applications*. RSC Medicinal Chemistry, 2021. **12**(11): p. 1826-1838.
63. Zhang, X., et al., *Immobilizable fluorescent probes for monitoring the mitochondria microenvironment: a next step from the classic*. Journal of Materials Chemistry B, 2019. **7**(17): p. 2749-2758.
64. Yin, J., et al., *Small molecule based fluorescent chemosensors for imaging the microenvironment within specific cellular regions*. Chemical Society Reviews, 2021. **50**(21): p. 12098-12150.
65. Ogle, M.M., et al., *Latest Trends in Temperature Sensing by Molecular Probes*. ChemPhotoChem, 2020. **4**(4): p. 255-270.
66. National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis>.
67. Fass, L., *Imaging and cancer: A review*. Molecular Oncology, 2008. **2**(2): p. 115-152.
68. *Electromagnetic spectrum. different types of electromagnetic radiation by their wavelengths. In order of increasing frequency and decreasing wavelength*
<https://www.dreamstime.com/stock-illustration-electromagnetic-spectrum-different-types-radiation-their-wavelengths-order-increasing-frequency-image75848163>.
69. Kyrkou, S.G., et al., *Design Principles Governing the Development of Theranostic Anticancer Agents and Their Nanoformulations with Photoacoustic Properties*. Pharmaceutics, 2022. **14**(2): p. 362.
70. Chinen, A.B., et al., *Nanoparticle Probes for the Detection of Cancer Biomarkers, Cells, and Tissues by Fluorescence*. Chemical Reviews, 2015. **115**(19): p. 10530-10574.
71. *Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy*, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, J.R. Lakowicz, Editor. 2006, Springer US: Boston, MA. p. 27-61.
72. Zheng, M., et al., *Determining the Energy Gap between the S1 and T1 States of Thermally Activated Delayed Fluorescence Molecular Systems Using Transient Fluorescence Spectroscopy*. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2022. **13**(11): p. 2507-2515.
73. Luo, S., et al., *A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging*. Biomaterials, 2011. **32**(29): p. 7127-7138.
74. Chowdhury, P. and Y.-H. Chan, *Recent advances in D–A–D based Pdots with NIR-II fluorescence for deep-tissue imaging*. Molecular Systems Design & Engineering, 2022. **7**(7): p. 702-719.
75. Meng, X., et al., *Recent Advances in Near-Infrared-II Fluorescence Imaging for Deep-Tissue Molecular Analysis and Cancer Diagnosis*. Small, 2022. **18**(31): p. 2202035.
76. Agostinis, P., et al., *Photodynamic therapy of cancer: An update*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2011. **61**(4): p. 250-281.
77. Pal, A., et al., *A detailed insight into anion sensing based on intramolecular charge transfer (ICT) mechanism: A comprehensive review of the years 2016 to 2021*. Coordination Chemistry Reviews, 2021. **448**: p. 214167.

78. Grabowski, Z.R., K. Rotkiewicz, and W. Rettig, *Structural changes accompanying intramolecular electron transfer: focus on twisted intramolecular charge-transfer states and structures*. Chem Rev, 2003. **103**(10): p. 3899-4032.
79. Wang, C., et al., *Twisted intramolecular charge transfer (TICT) and twists beyond TICT: from mechanisms to rational designs of bright and sensitive fluorophores*. Chemical Society Reviews, 2021. **50**(22): p. 12656-12678.
80. Sasaki, S., G.P.C. Drummen, and G.-i. Konishi, *Recent advances in twisted intramolecular charge transfer (TICT) fluorescence and related phenomena in materials chemistry*. Journal of Materials Chemistry C, 2016. **4**(14): p. 2731-2743.
81. Ma, C., et al., *A minireview of viscosity-sensitive fluorescent probes: design and biological applications*. Journal of Materials Chemistry B, 2020. **8**(42): p. 9642-9651.
82. Patrizi, B., et al., *Synergistic Approach of Ultrafast Spectroscopy and Molecular Simulations in the Characterization of Intramolecular Charge Transfer in Push-Pull Molecules*. Molecules, 2020. **25**(2): p. 430.
83. Mikhnenko, O.V., P.W.M. Blom, and T.-Q. Nguyen, *Exciton diffusion in organic semiconductors*. Energy & Environmental Science, 2015. **8**(7): p. 1867-1888.
84. National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>.
85. Li, X., et al., *Activatable Photosensitizers: Agents for Selective Photodynamic Therapy*. Advanced Functional Materials, 2017. **27**(5): p. 1604053.
86. Lan, M., et al., *Photosensitizers for Photodynamic Therapy*. Advanced Healthcare Materials, 2019. **8**(13): p. 1900132.
87. Hu, F., S. Xu, and B. Liu, *Photosensitizers with Aggregation-Induced Emission: Materials and Biomedical Applications*. Advanced Materials, 2018. **30**(45): p. 1801350.
88. Van Straten, D., et al., *Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions*. Cancers, 2017. **9**(2): p. 19.
89. Zhou, Z., et al., *Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy*. Chemical Society Reviews, 2016. **45**(23): p. 6597-6626.
90. Li, Y., et al., *Cyanine conjugates in cancer theranostics*. Bioactive Materials, 2021. **6**(3): p. 794-809.
91. Zhong, J., et al., *In vivo photoacoustic therapy with cancer-targeted indocyanine green-containing nanoparticles*. Nanomedicine, 2013. **8**(6): p. 903-919.
92. Vrettos, E.I., G. Mező, and A.G. Tzakos, *On the design principles of peptide-drug conjugates for targeted drug delivery to the malignant tumor site*. Beilstein J Org Chem, 2018. **14**: p. 930-954.
93. Li, H., et al., *Activity-based NIR fluorescent probes based on the versatile hemicyanine scaffold: design strategy, biomedical applications, and outlook*. Chemical Society Reviews, 2022. **51**(5): p. 1795-1835.
94. Zeng, Z., et al., *Hemicyanine-Based Near-Infrared Activatable Probes for Imaging and Diagnosis of Diseases*. Angewandte Chemie International Edition, 2021. **60**(51): p. 26454-26475.
95. Dekić, M., et al., *Synthesis and theoretical investigation of some new 4-substituted flavylum salts*. Food Chemistry, 2017. **229**: p. 688-694.
96. Forscher, R., et al., *Flavylum Salts: A Blooming Core for Bioinspired Ionic Liquid Crystals*. Chemistry – A European Journal, 2019. **25**(56): p. 12966-12980.
97. Alas, M., A. Saghaeidehkordi, and K. Kaur, *Peptide–Drug Conjugates with Different Linkers for Cancer Therapy*. Journal of Medicinal Chemistry, 2021. **64**(1): p. 216-232.
98. Chang, M., et al., *Smart linkers in polymer–drug conjugates for tumor-targeted delivery*. Journal of Drug Targeting, 2016. **24**(6): p. 475-491.
99. Gonzaga, R.V., et al., *Perspectives About Self-Immolative Drug Delivery Systems*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020. **109**(11): p. 3262-3281.
100. Li, M., et al., *A near-infrared colorimetric fluorescent chemodosimeter for the detection of glutathione in living cells*. Chemical Communications, 2014. **50**(14): p. 1751-1753.

101. Zhang, J., et al., *A Near-Infrared Fluorescence Probe for Thiols Based on Analyte-Specific Cleavage of Carbamate and Its Application in Bioimaging*. European Journal of Organic Chemistry, 2015. **2015**(8): p. 1711-1718.
102. van Beurden, K., et al., *The Knoevenagel reaction: a review of the unfinished treasure map to forming carbon–carbon bonds*. Green Chemistry Letters and Reviews, 2020. **13**(4): p. 349-364.
103. Breugst, M. and H.U. Reissig, *The Huisgen Reaction: Milestones of the 1,3-Dipolar Cycloaddition*. Angew Chem Int Ed Engl, 2020. **59**(30): p. 12293-12307.
104. Wodtke, R., et al., *NMR-based investigations of acyl-functionalized piperazines concerning their conformational behavior in solution*. RSC Advances, 2018. **8**(71): p. 40921-40933.
105. Bubbs, W.A., *NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity*. Concepts in Magnetic Resonance Part A, 2003. **19A**(1): p. 1-19.
106. Klymchenko, A.S., *Solvatochromic and Fluorogenic Dyes as Environment-Sensitive Probes: Design and Biological Applications*. Accounts of Chemical Research, 2017. **50**(2): p. 366-375.
107. Vyšniauskas, A., et al., *Unravelling the effect of temperature on viscosity-sensitive fluorescent molecular rotors*. Chemical Science, 2015. **6**(10): p. 5773-5778.
108. Sun, Y.-Q., et al., *Fluorescent probe for biological gas SO₂ derivatives bisulfite and sulfite*. Chemical Communications, 2013. **49**(26): p. 2637-2639.
109. Ioele, G., et al., *Anticancer Drugs: Recent Strategies to Improve Stability Profile, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties*. Molecules, 2022. **27**(17): p. 5436.
110. Hintze, C., T.O. Morgen, and M. Drescher, *Heavy-atom effect on optically excited triplet state kinetics*. PLoS One, 2017. **12**(11): p. e0184239.
111. Zanolto, R.P., et al., *Structure-activity study of furyl aryloxazole fluorescent probes for the detection of singlet oxygen*. PLoS One, 2018. **13**(7): p. e0200006.
112. Tan, G., et al., *The in vitro photodynamic activity, photophysical and photochemical research of a novel chlorophyll-derived photosensitizer*. Medicinal Chemistry Research, 2017. **26**(10): p. 2639-2652.
113. Neagu, M., et al., *Toxicological and efficacy assessment of post-transition metal (Indium) phthalocyanine for photodynamic therapy in neuroblastoma*. Oncotarget, 2016. **7**(43): p. 69718-69732.
114. Weinberg, S.E. and N.S. Chandel, *Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy*. Nature Chemical Biology, 2015. **11**(1): p. 9-15.
115. Johri, A. and M.F. Beal, *Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2012. **342**(3): p. 619.
116. Chow, J., et al., *Mitochondrial disease and endocrine dysfunction*. Nature Reviews Endocrinology, 2017. **13**(2): p. 92-104.
117. Vyas, S., E. Zaganjor, and M.C. Haigis, *Mitochondria and Cancer*. Cell, 2016. **166**(3): p. 555-566.
118. Dombroski, A., et al., *Implementing parallel arithmetic via acetylation and its application to chemical image processing*. Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 2021. **477**(2248): p. 20200899.
119. Kürti, L.C., Barbara, *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis: Background and Detailed Mechanisms*. , E.A. Press, Editor. 2005.
120. Klein, D.R., *Organic Chemistry*. 2017: John Wiley & Sons.
121. Al-Bittar, S., *3-Deoxyanthocyanins : Chemical synthesis, structural transformations, affinity for metal ions and serum albumin, antioxidant activity*. 2016.
122. Cosco, E.D., et al., *Flavylium Polymethine Fluorophores for Near- and Shortwave Infrared Imaging*. Angewandte Chemie International Edition, 2017. **56**(42): p. 13126-13129.
123. Gomori, G., *[16] Preparation of buffers for use in enzyme studies*, in *Methods in Enzymology*. 1955, Academic Press. p. 138-146.
124. Yao, D., et al., *An ALP-activatable and mitochondria-targeted probe for prostate cancer-specific bimodal imaging and aggregation-enhanced photothermal therapy*. Nanoscale, 2019. **11**(13): p. 6307-6314.

125. Luo, X., et al., *A camptothecin prodrug induces mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells with cascade activations*. Chemical Communications, 2021.
126. Cha, J.Y., Y. Huang, and T.R.R. Pettus, *Total Synthesis of TK-57-164A, Isariotin F, and Their Putative Progenitor Isariotin E*. Angewandte Chemie International Edition, 2009. **48**(50): p. 9519-9521.
127. Potter, G.T., et al., *An Updated Synthesis of the Diazo-Transfer Reagent Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrogen Sulfate*. The Journal of Organic Chemistry, 2016. **81**(8): p. 3443-3446.
128. Shin, W.S., et al., *Mitochondria-targeted aggregation induced emission theranostics: crucial importance of in situ activation*. Chemical Science, 2016. **7**(9): p. 6050-6059.
129. Wang, X., et al., *Visual monitoring of the lysosomal pH changes during autophagy with a red-emission fluorescent probe*. Journal of Materials Chemistry B, 2020. **8**(7): p. 1466-1471.
130. Chen, L., et al., *A novel pH "off-on" fluorescent probe for lysosome imaging*. RSC Advances, 2013. **3**(32): p. 13412-13416.
131. Luo, S., et al., *A fluorescent turn-on probe for visualizing lysosomes in hypoxic tumor cells*. Analyst, 2016. **141**(10): p. 2879-2882.
132. Kong, X., et al., *Lysosome-targeting turn-on red/NIR BODIPY probes for imaging hypoxic cells*. Chemical Communications, 2019. **55**(77): p. 11567-11570.
133. Safir Filho, M., et al., *Development of highly sensitive fluorescent probes for the detection of β -galactosidase activity – application to the real-time monitoring of senescence in live cells*. Analyst, 2018. **143**(11): p. 2680-2688.
134. Sklirou, A.D., et al., *6-bromo-indirubin-3'-oxime (6BIO), a Glycogen synthase kinase-3 β inhibitor, activates cytoprotective cellular modules and suppresses cellular senescence-mediated biomolecular damage in human fibroblasts*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 11713.
135. Dasari, A., et al., *Oxidative Stress Induces Premature Senescence by Stimulating Caveolin-1 Gene Transcription through p38 Mitogen-Activated Protein Kinase/Sp1-Mediated Activation of Two GC-Rich Promoter Elements*. Cancer Research, 2006. **66**(22): p. 10805-10814.
136. Takata, T., Y. Motoo, and N. Tomosugi, *Effect of Saikokeishito, a Kampo medicine, on hydrogen peroxide-induced premature senescence of normal human dermal fibroblasts*. Journal of Integrative Medicine, 2014. **12**(6): p. 495-503.
137. Brandl, A., et al., *Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells*. Experimental Cell Research, 2011. **317**(11): p. 1541-1547.
1. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1029-1033.
2. Li, M., et al., *Piperazine-Based Mitochondria-Immobilized pH Fluorescent Probe for Imaging Endogenous ONOO⁻ and Real-Time Tracking of Mitophagy*. ACS Applied Bio Materials, 2022. **5**(6): p. 2777-2785.
3. Wang, X., et al., *Real-Time Monitoring Mitochondrial Viscosity during Mitophagy Using a Mitochondria-Immobilized Near-Infrared Aggregation-Induced Emission Probe*. Analytical Chemistry, 2021. **93**(6): p. 3241-3249.
4. Zhou, L., et al., *A highly sensitive endoplasmic reticulum-targeting fluorescent probe for the imaging of endogenous H₂S in live cells*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020. **240**: p. 118578.
5. Huang, K., et al., *Cascade reaction and FRET-based fluorescent probe for the colorimetric and ratiometric signaling of hydrogen sulfide*. Tetrahedron Letters, 2015. **56**(24): p. 3769-3773.
6. Ravilla, L., N. Venkata Subba Naidu, and K. Nagarajan, *An efficient scale up process for synthesis of N-arylpiperazines*. Tetrahedron Letters, 2015. **56**(30): p. 4541-4544.
7. LG CHEM CO.,LTD. - US2011/166121, 2011, A1.
8. Vilsmeier-Haack Reaction <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/vilsmeier-reaction.shtml>. Available from: <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/vilsmeier-reaction.shtml>.

9. Lingam, V.S.P.R., et al., *A simple approach to highly functionalized benzo[b]furans from phenols and aryl iodides via aryl propargyl ethers*. Tetrahedron Letters, 2008. **49**(27): p. 4260-4264.
10. Popov, I.I., *Investigations of unsaturated azoles. 13. Synthesis and some reactions of 1-alkylbenzimidazoles*. Chemistry of Heterocyclic Compounds, 1996. **32**(6): p. 672-681.
11. Tamaddon, F., et al., *Dolomite (CaMg(CO₃)₂) as a recyclable natural catalyst in Henry, Knoevenagel, and Michael reactions*. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 2013. **366**: p. 36-42.
12. FDA-Drug Approvals and Databases-methylene blue
<https://www.fda.gov/search?s=methylene+blue>. Available from:
<https://www.fda.gov/search?s=methylene+blue>.
13. FDA-Drug Approvals and Databases-indocyanine green
https://www.fda.gov/search?s=indocyanine+green&sort_bef_combine=rel_DESC. Available from:
https://www.fda.gov/search?s=indocyanine+green&sort_bef_combine=rel_DESC.
14. Acid catalyzed acetylation
http://wwwchem.uwimona.edu.jm/lab_manuals/c1901exp12.html.
15. Fries Rearrangement <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/fries-rearrangement.shtm>.
16. Cruz, L., et al., *Natural and Synthetic Flavylum-Based Dyes: The Chemistry Behind the Color*. Chemical Reviews, 2022. **122**(1): p. 1416-1481.
17. Zhang, P., et al., *A viscosity-sensitive iridium(iii) probe for lysosomal microviscosity quantification and blood viscosity detection in diabetic mice*. Dalton Transactions, 2019. **48**(12): p. 3990-3997.
18. Li, X., et al., *A new GFP fluorophore-based probe for lysosome labelling and tracing lysosomal viscosity in live cells*. Journal of Materials Chemistry B, 2018. **6**(41): p. 6592-6598.
19. Tan, H.-y., et al., *A lysosome-targeting dual-functional fluorescent probe for imaging intracellular viscosity and beta-amyloid*. Chemical Communications, 2019. **55**(18): p. 2688-2691.
20. Liu, C., et al., *A lysosome-targeting viscosity-sensitive fluorescent probe based on a novel functionalised near-infrared xanthene-indolium dye and its application in living cells*. Journal of Materials Chemistry B, 2020. **8**(38): p. 8838-8844.
21. Wang, L., et al., *Activatable Rotor for Quantifying Lysosomal Viscosity in Living Cells*. Journal of the American Chemical Society, 2013. **135**(8): p. 2903-2906.
22. Park, J., et al., *Dual-functioning IQ-LVs as lysosomal viscosity probes with red-shifted emission and inhibitors of autophagic flux*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2020. **309**: p. 127764.
23. Wei, Y.-F., et al., *Simultaneous imaging of lysosomal and mitochondrial viscosity under different conditions using a NIR probe*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2021. **326**: p. 128954.
24. Bera, K., et al., *Extracellular fluid viscosity enhances cell migration and cancer dissemination*. Nature, 2022. **611**(7935): p. 365-373.
25. Association, G.P., *Physical Properties of Glycerine and Its Solutions*. 1963: Glycerine Producers' Association.