

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

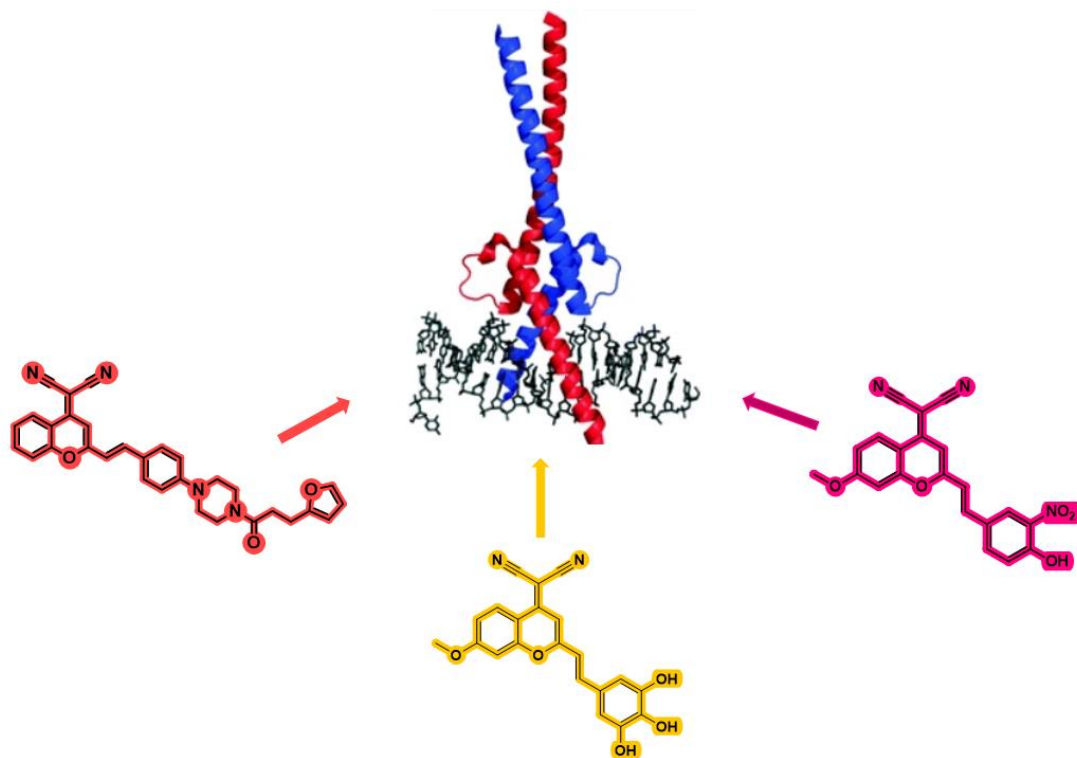
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**«ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΣΤΟΧΕΥΟΥΝ ΣΤΗΝ
ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ ΜΥC-MAX ΚΑΙ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΝΟΝΤΑΙ ΣΤΟ
ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ»**



ΙΩΑΝΝΗΣ ΝΙΚΟΥΛΗΣ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2023

Εισαγωγή στο Π.Μ.Σ. του Ιωάννη Νικούλη: 25-09-2021

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: Καθηγητής κος Τζάκος Ανδρέας

Θέμα: «Σχεδιασμός, σύνθεση και αξιολόγηση ενώσεων που στοχεύουν στην αναστολή του συμπλόκου Mgc-Max και ανταποκρίνονται στο μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων» .

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.:

- 1. Τζάκος Ανδρέας**
- 2. Μαλανδρίνος Γεράσιμος**
- 3. Κουρκουμέλης Νικόλαος**

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

Ευχαριστίες

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

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Ανδρέα Τζάκο για την ανάθεση και την επίβλεψη του θέματος. Από την πρώτη μου μέρα στην ερευνητική του ομάδα, ο κ. Τζάκος μου έδειξε εμπιστοσύνη και μου ανέθεσε ενεργό ρόλο στο εργαστήριό του. Με παρότρυνε συνεχώς να συζητάμε για τις απορίες μου, τα λάθη μου και τις δυσκολίες που συναντούσα και με την καθοδήγησή του κατάφερνα να βρίσκω λύσεις συνεχίζοντας απρόσκοπτα το έργο μου. Θέλω, επίσης, να τον ευχαριστήσω για το γεγονός ότι κατανόησε τον χαρακτήρα και τις ανάγκες μου, δίνοντάς μου όσο χώρο και χρόνο χρειαζόμουν για να εξελιχθώ ως άνθρωπος και ως επιστήμονας.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές που αποδέχτηκαν την πρόσκληση και αποτελούν μέλη της τριμελούς επιτροπής μου καθώς και την ερευνητική ομάδα του καθηγητή κ. Χριστοφορίδη για την βιολογική αξιολόγηση των ενώσεών μου. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω το κέντρο NMR και κέντρο μάζας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Σταυρούλα Κύρκου και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Θωμά Αντωνίου και Βασίλη- Παναγιώτη Μπίστα για την στήριξή τους εντός και εκτός του εργαστηρίου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους διδάκτορες Δημήτριο Διαμαντή και Χρήστο Χατζηγιάννη για την καθοδήγηση που μου παρείχαν σε όλο το εύρος της συνεργασίας μας, όπως και τους φίλους και συνεργάτες που δουλέψαμε στο ίδιο εργαστήριο και συγκεκριμένα τους Βασίλη Γκάλπινο, Σπυρίδων Κατσάκο, Ρένο Βρέττο, Αντώνη Τσιαϊλάνη, Ab Ganai Majeed, Ανδρονίκη Κωσταγιάννη, Αλέξανδρο Σαρκισιάν, Χριστόδουλο Φασούλη, Λέανδρο Πολυχρόνη, Σταμάτη Πασσάδη και τον φίλο μου Γιάννη Σκεύα.

Τέλος, θα ήθελα να δώσω ξεχωριστές ευχαριστίες στην οικογένειά μου και συγκεκριμένα στους γονείς μου Δημήτρη και Ελένη, στην αδερφή μου Λευκοθέα, στους παππούδες μου και στις γιαγιάδες μου Γιάννη, Λευκή, Γιάννη και Χρυσούλα. Δε μπορώ να βρω λόγια για να αποτυπώσω το πόσο με βοήθησαν στην όλη διαδικασία. Τους είμαι ευγνώμων για όλα.

Περιεχόμενα

Συντμήσεις.....	7
Περίληψη.....	8
Abstract.....	9
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....	10
1.1 Στατιστικά και γενικά στοιχεία για τον καρκίνο.....	10
1.2 Ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων.....	12
1.2.1 Επάρκεια μηνυμάτων επαγωγής της κυτταρικής διαίρεσης.....	12
1.2.2 Απευαισθητοποίηση σε σήματα καταστολής της ανάπτυξης.....	13
1.2.3 Αποφυγή της απόπτωσης.....	13
1.2.4 Αγγειογένεση.....	14
1.2.5 Απεριόριστη πολλαπλασιαστική δυνατότητα.....	14
1.2.6 Μετάσταση.....	14
1.2.7 Επαναπρογραμματισμός του μεταβολισμού.....	15
1.2.8 Αποφυγή από την απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος.....	15
1.3 Μικροπεριβάλλον καρκινικών κυττάρων.....	15
1.3.1 Συνθήκες υποξίας.....	16
1.3.2 Warburg effect.....	16
1.3.3 Όξινο περιβάλλον.....	17
1.3.4 Φαινόμενο αυξημένης διαπερατότητας και κατακράτησης.....	18
1.3.5 Ιξώδες.....	19
1.4 Υπερέκφραση νιτροαναγωγάσης.....	19
1.5 Διάγνωση του καρκίνου και φθορισμός.....	20
1.6 Φασματοσκοπία απορρόφησης και φασματοσκοπία φθορισμού.....	22
1.6.1 Επίδραση του περιβάλλοντος στο φάσμα απορρόφησης.....	24
1.6.2 Φθορισμός.....	25
1.6.3 Επίδραση του διαλύτη.....	27
1.6.4 Φαινόμενα φθορισμού.....	28

1.6.4.1 Ενδομοριακή μεταφορά φορτίου.....	28
1.6.4.2 Περιστρεφόμενη ενδομοριακή μεταφορά φορτίου.....	29
1.7 Συμβατικές τεχνικές αντιμετώπισης του καρκίνου και ανάπτυξη αναστολέων.....	30
1.7.1 Χημειοθεραπεία.....	30
1.7.2 Χειρουργική επέμβαση.....	30
1.7.3 Ραδιοθεραπεία.....	31
1.8 Σχέση πρωτεΐνης Μγc-καρκίνου.....	32
1.9 Στοχεύοντας το σύμπλοκο Μγc-Max.....	34
1.10 Σκοπός.....	35
Κεφάλαιο 2: Πειραματικό μέρος.....	35
2.1 Υλικά και μέθοδοι.....	35
2.2 Σύνθεση και αξιολόγηση πιθανών αναστολέων του σχηματισμού του συμπλόκου Μγc-Max (ενώσεις 8 και 9).....	36
2.2.1 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 1.....	38
2.2.2 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 2.....	40
2.2.3 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 3.....	42
2.2.4 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 4.....	44
2.2.5 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 5.....	46
2.2.6 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 6.....	48
2.2.7 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 7.....	50
2.2.8 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 8.....	52
2.2.9 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 9.....	54
2.2.10 Φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης 8.....	56
2.2.10.1 Επίδραση του διαλύτη.....	58
2.2.10.2 Ανταπόκριση στο ιώδες.....	59
2.2.10.3 Επίδραση του pH.....	61
2.2.10.4 Ανταπόκριση στις μεταβολές της πολικότητας.....	62
2.2.11 Αξιολόγηση των ενώσεων 8 και 9 ως προς την ικανότητα αναστολής του σχηματισμού του συμπλόκου Μγc-Max.....	64
2.3 Σύνθεση και αξιολόγηση πιθανού αναστολέα του σχηματισμού του συμπλόκου Μγc-Max (ένωση 13).....	66
2.3.1 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 10.....	66
2.3.2 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 11α.....	69
2.3.3 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 11.....	71
2.3.4 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 12.....	73
2.3.5 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 13.....	77
2.3.6 Φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης 13.....	82
2.3.6.1 Επίδραση του διαλύτη.....	84
2.3.6.2 Ανταπόκριση στο ιώδες.....	85
2.3.6.3 Επίδραση του pH.....	86

2.3.6.4 Ανταπόκριση στις μεταβολές της πολικότητας.....	87
2.3.7 Αξιολόγηση της ένωσης 13 ως προς την ικανότητα αναστολής του σχηματισμού του συμπλόκου Myc-Max.....	88
2.4 Σύνθεση και αξιολόγηση πιθανού αναστολέα του σχηματισμού του συμπλόκου Myc-Max (ένωση 14).....	89
2.4.1 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 14.....	89
2.4.2 Φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης 14.....	92
2.4.2.1 Επίδραση του διαλύτη.....	94
2.4.2.2 Ανταπόκριση στο ιώδες.....	95
2.4.2.3 Επίδραση του pH.....	97
2.4.2.4 Ανταπόκριση στις μεταβολές της πολικότητας.....	98
2.4.2.5 Έλεγχος ανταπόκρισης στο συνένζυμο NADPH.....	99
2.4.3 Αξιολόγηση της ένωσης 14 ως προς την ικανότητα αναστολής του σχηματισμού του συμπλόκου Myc-Max.....	104
Κεφάλαιο 3: Συμπεράσματα και συζήτηση.....	104
Κεφάλαιο 4: Βιβλιογραφία.....	105

Συντμήσεις

Συντμήσεις	Ονομασία στην ελληνική
ACN/ MeCN	Ακετονιτρίλιο
BW (bandwidths)	Εύρη ζώνης (τα κενά των παραθύρων διέγερσης και εκπομπής του φασματοφωτόμετρου φωταύγειας)
DCC	N,N-δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο
DCM	Διχλωρομεθάνιο
DMF	N,N διμεθυλοφορμαμίδιο
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
EtOAC	Οξικός αιθυλεστέρας
H ₂ O	Νερό
HCl	Υδροχλωρικό οξύ
ICT	Ενδομοριακή Μεταφορά φορτίου
K ₂ CO ₃	Ανθρακικό κάλιο
MeOH	Μεθανόλη
MRI	Απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού
MS	Φασματομετρία μάζης
NADPH	Ανηγμένο φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης
NADH	Ανηγμένο δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης
Na ₂ SO ₄	Θειικό νάτριο
NMR	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
NTR	Νιτροαναγωγή
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
rt	Θερμοκρασία δωματίου

TFA	Τριφθοροξικό οξύ
TICT	Περιστρεφόμενη ενδομοριακή μεταφορά φορτίου
UV-Vis	Ορατό-Υπεριώδες
FL	Φθορισμός
PBS	Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών (Phosphate Buffer saline)

Περίληψη

Ο αριθμός των διαγνώσεων και των θανάτων λόγω καρκίνου αυξάνεται διαρκώς τα τελευταία χρόνια, παρά την ραγδαία εξέλιξη της ιατρικής. Ο καρκίνος, όμως, αποτελεί μία ξεχωριστή περίπτωση. Με τον όρο «καρκίνο» χαρακτηρίζονται περισσότερες από 200 ξεχωριστές ασθένειες, καθεμία από τις οποίες έχει τα δικά της χαρακτηριστικά και χρήζει ξεχωριστής αντιμετώπισης. Υπάρχουν, παρόλα αυτά, ορισμένες ιδιότητες που τις μοιράζονται όλα ή πολλά από τα «είδη» καρκίνου, όπως για παράδειγμα ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η αποφυγή του κυτταρικού θανάτου και η υπερέκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών.

Η έρευνα ως προς την κατανόηση των καρκινικών κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος του όγκου έχει δώσει σημαντικά στοιχεία στους ερευνητές ώστε να αναπτυχθούν καινοτόμες θεραπείες, οι οποίες δίνουν λύση στα προβλήματα των συμβατικών θεραπειών.

Μία τέτοια θεραπεία είναι η ανάπτυξη ενώσεων μικρού μοριακού βάρους που δρουν ως αναστολείς πρωτεϊνών που υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα, όπως η πρωτεΐνη Mgc. Έτσι, λοιπόν, σχεδιάστηκαν, συντέθηκαν και αξιολογήθηκαν τρία νέα θεραπευγνωστικά μόρια τα οποία στοχεύουν τον δύσκολα στοχεύσιμο φαρμακευτικό στόχο της Mgc. Σχεδιάστηκαν ώστε να αναστέλλουν τον σχηματισμό του διμερούς των πρωτεϊνών Mgc – Max και κατά την αλληλεπίδραση με την Mgc αναμένεται η αλλαγή των φωτοφυσικών τους ιδιοτήτων.

Και τα τρία μόρια βρέθηκε ότι αναστέλλουν αποτελεσματικά το σχηματισμό του ετεροδιμερούς Mgc-Max. Επίσης, και τα τρία μόρια φθορίζουν στην περιοχή του Εγγύς Υπερύθρου, όπως είναι επιθυμητό για όλα τα θεραπευγνωστικά μόρια. Δύο από τα τρία μόρια, βρέθηκε ότι μεταβάλλουν τις φωτοφυσικές τους ιδιότητες όταν βρεθούν σε περιβάλλον που περιορίζει την περιστροφή τους. Έτσι υποθέτουμε ότι θα αυξάνουν την ένταση του φθορισμού τους μετά την πρόσδεσή τους με την πρωτεΐνη Mgc.

Οι ενδιάμεσες και τελικές ενώσεις καθαρίστηκαν με κατάλληλες τεχνικές όπως η χρωματογραφία στήλης και HPLC και ταυτοποιήθηκαν με 1D/2D φασματοσκοπία NMR. Ακολούθησαν πειράματα μέσω φασματοσκοπίας UV-Vis και φθορισμού όπου ελέγχθηκε η απόκριση, η ταχύτητα απόκρισης και η εκλεκτικότητα των ενώσεων παρουσία κατάλληλου αναλύτη, καθώς και βιολογική αξιολόγηση σε κατάλληλες καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Abstract

The number of diagnosed cases and deaths due to cancer is constantly rising the last years, despite the evolution of medicine. Cancer is a special case of disease. The term “cancer” is used to characterize more than 200 unique diseases, each one of those has its own characteristics and requires special treatment. Nonetheless, there are some properties that are almost ubiquitous amongst the cancer cells, such as the uncontrolled cell proliferation, the programmed cell death evasion and the up regulation of specific proteins.

The research around cancer cells and cancer microenvironment has provided some very important clues. This enables the development of novel therapies, which solve the problems of conventional anticancer therapies.

One such therapy is the development of small molecule inhibitors for proteins that are up regulated in cancer cells, such as the Myc protein. With that in mind, we designed, synthesized and evaluated three theranostic molecules which target, the difficult to target, Myc protein. The molecules were designed to inhibit the dimer formation between the Myc and the Max proteins. Also the molecules were evaluated for possible alterations in their photophysical spectra after interaction with Myc.

It was proved that all the molecules that we synthesized are potent inhibitors of the Myc-Max complex formation. Moreover, both three molecules have a fluorescence emission in the Near Infrared spectrum, which is desired for theranostic molecules. It was shown that two of the molecules alter their photophysical properties when they exist in an environment that limits their rotation. So we assumed that their fluorescence will be enhanced after their interaction with Myc protein.

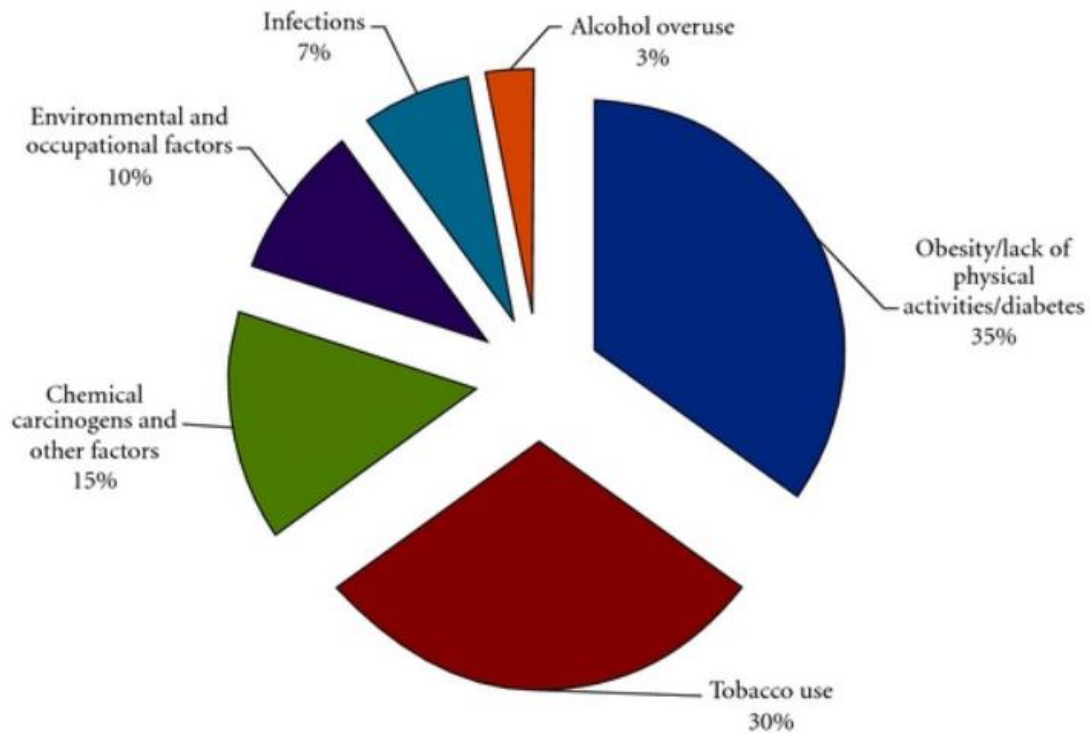
The intermediate and final compounds were purified by suitable techniques such as column chromatography and HPLC and characterized by 1D/2D NMR spectroscopy. Experiments followed by UV-Vis and fluorescence spectroscopy where the response and selectivity of the compounds in the presence of a suitable analyte were checked, as well as biological evaluation in suitable cell lines

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Στατιστικά και γενικά στοιχεία για τον καρκίνο

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Σύμφωνα με εκτιμήσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας το 2019, ο καρκίνος είναι η πρώτη ή δεύτερη αιτία θανάτου σε ηλικίες μέχρι 70 ετών σε 112 χώρες, παίζοντας σημαντικό ρόλο στη δυσκολία αύξησης του προσδόκιμου ζωής [1]. Σύμφωνα με προβλέψεις της American Cancer Society, το 2023 αναμένονται στην Αμερική περισσότερες από 1,9 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου, δηλαδή περισσότερες από 5300 ημερησίως. Για τους άντρες, οι καρκίνοι του προστάτη, των πνευμόνων και του παχέος εντέρου ευθύνονται για το 48% των περιπτώσεων, με τον καρκίνο του προστάτη να αποτελεί το 29% όλων των περιπτώσεων. Αντίστοιχα, για τις γυναίκες, οι καρκίνοι του μαστού, των πνευμόνων και του παχέος εντέρου ευθύνονται για το 52% των διαγνώσεων, με τον καρκίνο του μαστού να αποτελεί το 31% όλων των περιπτώσεων. Για τις νέες εκτιμώμενες περιπτώσεις καρκίνου το 2023 στην Αμερική αναμένονται περισσότεροι από 600.000 θάνατοι [2].

Η καρκινογένεση είναι μία διαδικασία πολλών βημάτων που οφείλεται στον συνδυασμό πολλών παραγόντων. Η αρχή γίνεται μέσω της καταστροφής του γονιδιώματος των κυττάρων. Αυτή η καταστροφή είτε κληρονομείται από τους προγόνους είτε προκύπτει κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου. Η κατηγορία των επίκτητων περιστατικών καρκινογένεσης οφείλεται στον τρόπο ζωής των ανθρώπων. Συγκεκριμένα, 1/3 των καρκίνων προκύπτει λόγω του καπνίσματος, 1/3 λόγω διαιτητικών και λοιπών ανθυγιεινών επιλογών και 1/5 λόγω μολύνσεων. Άλλοι παράγοντες είναι η έκθεση σε επικίνδυνες χημικές ενώσεις, περιβαλλοντικά ρυπογόνα και αλκοόλ [3].



Εικόνα 1. Παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη καρκίνου [3]

Σε μία προσπάθεια κατηγοριοποίησης των παραγόντων που οδηγούν σε καρκινογένεση, διακρίνουμε δύο μεγάλες κατηγορίες:

A) τους **μη-τροποποιήσιμους παράγοντες** (unmodifiable factors), που περιλαμβάνουν μεταλλάξεις οι οποίες συμβαίνουν τυχαία κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του DNA

B) τους **(μερικώς) τροποποιήσιμους παράγοντες** (-partially- modifiable factors). Οι μερικώς τροποποιήσιμοι παράγοντες περιλαμβάνουν τον μεταβολισμό, τα επίπεδα ορμονών και το ανοσοποιητικό σύστημα. Στους τροποποιήσιμους παράγοντες ανήκουν ο τρόπος ζωής (π.χ. κάπνισμα) και η έκθεση σε καρκινογόνα, ιούς και ξеноβιοτικά [4].

Intrinsic risk factors	Non-intrinsic risk factors	
	Endogenous risk factors	Exogenous risk factors
❖ Random errors in DNA replication	❖ Biologic aging ❖ Genetic susceptibility ❖ DNA repair machinery ❖ Hormones ❖ Growth factors ❖ Inflammation ❖ etc.	❖ Radiation ❖ Chemical carcinogens ❖ Tumour causing viruses ❖ Bad lifestyles such as smoking, lack of exercise, nutrient imbalance ❖ etc.
[Unmodifiable]	[Partially modifiable]	[Modifiable]

Εικόνα 2. Βιολογικά αίτια ανάπτυξης καρκίνου [4]

Ανάμεσα στο πρώτο καρκινογόνο ερέθισμα και την τελική εδραίωση του όγκου μπορούμε να διακρίνουμε τα εξής στάδια:

- Έναρξη
- Προώθηση
- Εξέλιξη

Το πρώτο στάδιο ξεκινάει με την επίδραση ενός καρκινογόνου πάνω στο χρωμοσωμικό DNA προκαλώντας μία αλλοίωση η οποία μπορεί να επιδιορθωθεί ή να αναπαραχθεί. Για τη διαδικασία της επιδιόρθωσης ένας σημαντικός παράγοντας είναι ο χρόνος. Για παράδειγμα, αν η μίτωση καθυστερήσει, τότε το DNA έχει τη δυνατότητα να επιδιορθωθεί. Σε άλλη περίπτωση, η αλλοίωση θα παραμείνει και θα μεταβιβαστεί στα καινούρια κύτταρα [5].

Κατά την Προώθηση, τα κύτταρα που περιέχουν τις αλλοιώσεις επεκτείνονται μέσω της αντιγραφής εις βάρος των υγιών κυττάρων. Σε αυτό το στάδιο εμφανίζονται και οι πρώτες αποκλίσεις από τον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης και της κυτταρικής διαφοροποίησης με αποτέλεσμα τη δημιουργία του όγκου [5],[6].

Στο τελευταίο στάδιο ο κακοήθης όγκος καθιερώνεται και προκαλεί αλλαγές που απειλούν την υγεία του ασθενή. Σημαντικά χαρακτηριστικά είναι η διαρκής εξάπλωση και η μετάσταση του όγκου [5].

1.2 Ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων

Το 2000 οι Hanahan και Weinberg δημοσίευσαν μία εργασία στην οποία συγκέντρωσαν τις κοινές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων. Σύμφωνα με τους συγγραφείς λοιπόν, οι ιδιότητες αυτές είναι:

- επάρκεια μηνυμάτων επαγωγής της κυτταρικής διαίρεσης
- απευαισθητοποίηση σε σήματα καταστολής της ανάπτυξης
- απεριόριστη πολλαπλασιαστική δυνατότητα
- η αγγειογένεση

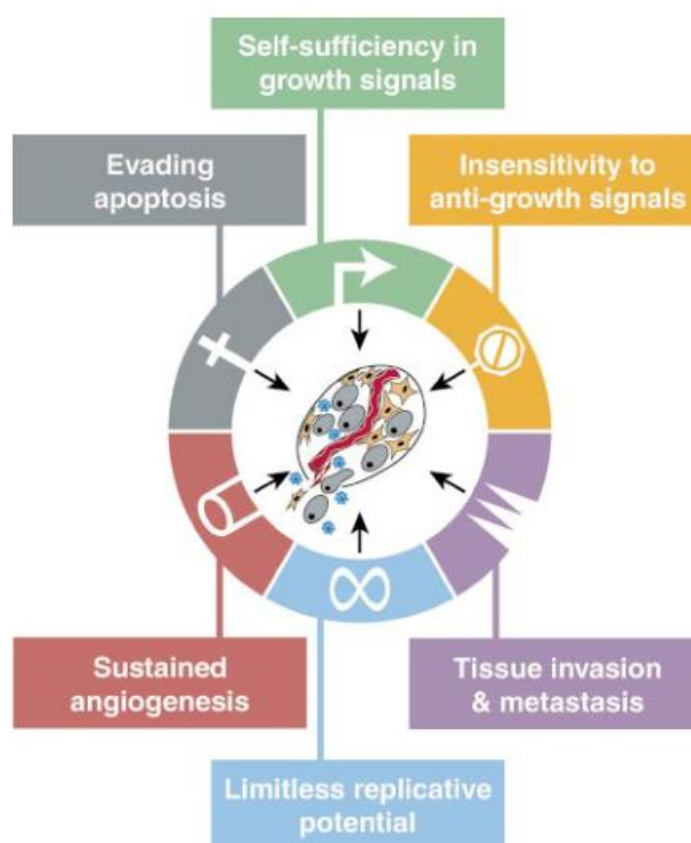
-η διαφυγή της απόπτωσης

-η μετάσταση[7]

Μία δεκαετία αργότερα, προστέθηκαν στη λίστα άλλες δύο ιδιότητες:

-επαναπρογραμματισμός του μεταβολισμού

-διαφυγή από την απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος [8], [9]



Εικόνα 3. Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης καρκίνου [7]

Αναλυτικότερα για κάθε ιδιότητα:

1.2.1 Επάρκεια μηνυμάτων επαγωγής της κυτταρικής διαίρεσης

Ένα από τα σπουδαιότερα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων είναι η ικανότητά τους να εξασφαλίζουν συνεχώς σήματα ταχείας εξάπλωσης. Σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς ιστούς, οι οποίοι ελέγχουν προσεκτικά την παραγωγή και απελευθέρωση σημάτων ανάπτυξης, τα καρκινικά κύτταρα απορρυθμίζουν τη συγκεκριμένη διαδικασία και αποκτούν έλεγχο του πολλαπλασιασμού τους. Έχουν την ικανότητα να παράγουν αυξητικούς παράγοντες, καθώς και τους συγγενικούς τους υποδοχείς (αυτοκρινής σηματοδότηση). Επίσης, μπορούν να στέλνουν σήματα σε γειτονικά υγιή κύτταρα, τα οποία ανταποδίδουν παρέχοντας στα κύτταρα του όγκου ποικίλους αυξητικούς παράγοντες [9],[10],[11].

1.2.2 Απευαισθητοποίηση σε σήματα καταστολής της ανάπτυξης

Στους φυσιολογικούς ιστούς υπάρχουν πολλά σήματα που διακόπτουν την κυτταρική ανάπτυξη και συντελούν στη διατήρηση της ομοιόστασης. Πρόκειται για ενώσεις-αναστολείς που προσδένονται σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια. Παρεκκλίσεις από αυτή τη διαδικασία είναι ικανές να οδηγήσουν σε ενίσχυση του πολλαπλασιασμού και της ανάπτυξης [7].

Τα αρχικά κύτταρα του όγκου πρέπει να αποφύγουν αυτά τα ανασταλτικά σήματα ώστε να αναπτυχθούν. Η ικανότητα των υγιών κυττάρων να ανταποκρίνονται σε αυτά τα σήματα σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με το στάδιο του κυτταρικού κύκλου που βρίσκεται το κύτταρο. Κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, τα κύτταρα ανιχνεύουν σήματα στο εξωτερικό τους περιβάλλον τα οποία δίνουν οδηγίες για το αν θα πολλαπλασιαστούν ή θα παραμείνουν όπως είναι. Τα περισσότερα από αυτά τα σήματα διοχετεύονται μέσα από την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Retinoblastoma protein, pRb). Σε κατάσταση υποφωσφορύλωσης, η pRb παρεμποδίζει την ανάπτυξη αλλάζοντας τη λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα E2F. Γενικά, ο E2F ενεργοποιεί γονίδια που σηματοδοτούν την έναρξη του πολλαπλασιασμού. Διαταραχές στο μονοπάτι της pRb έχουν ως αποτέλεσμα ο E2F να μην περιορίζεται και να ενεργοποιεί συνεχώς τα εν λόγω γονίδια. Έτσι, τα κύτταρα χάνουν την ευαισθησία σε αυτό το ανασταλτικό σήμα [7].

1.2.3 Αποφυγή της απόπτωσης

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος μέσω απόπτωσης αποτελεί ένα εμπόδιο στην ανάπτυξη του καρκίνου. Το «πρόγραμμα» της απόπτωσης υπάρχει σε κάθε κύτταρο του οργανισμού. Μόλις ενεργοποιηθεί, λαμβάνει χώρα μία σειρά από βήματα που οδηγούν στην απόπτωση: οι κυτταρικές μεμβράνες διασπώνται, ο κυτταροσκελετός καταρρέει, τα χρωμοσώματα αποσυντίθενται και ο πυρήνας θραυματοποιείται, όλα μέσα σε 30-120 λεπτά [12].

Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αποκτήσουν αντίσταση στην απόπτωση με διάφορες στρατηγικές. Μία συνηθισμένη περίπτωση είναι να εμφανίζονται μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53, το οποίο λειτουργεί ως αισθητήρας βλάβης του DNA. Το αποτέλεσμα που προκύπτει είναι η απενεργοποίηση της αντίστοιχης πρωτεΐνης p53, γεγονός που συναντάται σε ένα ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των ανθρώπινων καρκίνων και οδηγεί σε αδυναμία επαγωγής της απόπτωσης [7], [13]. Εναλλακτικά, οι όγκοι επιτυγχάνουν το ίδιο αποτέλεσμα μέσω αύξησης της έκφρασης αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών, μείωσης της έκφρασης προαποπτωτικών πρωτεϊνών ή παράκαμψης εξωκυττάρων σημάτων που οδηγούν στην απόπτωση [9].

1.2.4 Αγγειογένεση

Οι λειτουργίες και η επιβίωση των κυττάρων βασίζονται στην παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών από την κυκλοφορία του αίματος, για αυτό και όλα τα κύτταρα ενός ιστού βρίσκονται σε απόσταση έως 100 μm από κάποιο τριχοειδές αιμοφόρο αγγείο. Μόλις σχηματιστεί ένας ιστός, η διαδικασία της αγγειογένεσης ρυθμίζεται από τον οργανισμό [14],[15]. Υπάρχουν σήματα που ενισχύουν ή σταματούν την αγγειογένεση. Ένα χαρακτηριστικό σήμα ενίσχυσης της αγγειογένεσης είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, ο οποίος προσδένεται σε κατάλληλους διαμεμβρανικούς υποδοχείς των επιθηλιακών κυττάρων. Αντίθετα ένας αναστολέας της αγγειογένεσης είναι η θρομβοσπονδίνη-1, η οποία προσδένεται αντίστοιχα σε έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα των επιθηλιακών κυττάρων [16],[17].

Όπως οι φυσιολογικοί ιστοί, έτσι και οι όγκοι έχουν ανάγκη από οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, αλλά και να απομακρύνουν απόβλητα του ραγδαίου μεταβολισμού τους. Όλα αυτά καλύπτονται από τη διαδικασία της αγγειογένεσης, η οποία ξεκινά πολύ νωρίς κατά την ανάπτυξη του όγκου. Τα καρκινικά κύτταρα

ενεργοποιούν τη διαδικασία αυτή αλλάζοντας τις ισορροπίες ανάμεσα στους ενεργοποιητές και τους αναστολείς που τη ρυθμίζουν [9].

1.2.5 Απεριόριστη πολλαπλασιαστική δυνατότητα

Τα τρία χαρακτηριστικά που αναλύθηκαν παραπάνω σχετίζονται με την αποδέσμευση του κυττάρου από εξωκυττάρια μηνύματα που ρυθμίζουν την ανάπτυξή του. Τα περισσότερα – αν όχι όλα- κύτταρα των θηλαστικών φέρουν και ενδογενή προγράμματα ρύθμισης του πολλαπλασιασμού τους. Αυτά τα προγράμματα φέρονται να ενεργούν ανεξάρτητα από τα εξωτερικά σήματα που λαμβάνει το κύτταρο. Για να μπορέσει να δημιουργηθεί ένας όγκος, πρέπει και αυτό το «σύστημα ασφαλείας» να παρακαμφθεί. Έχει παρατηρηθεί ότι καρκινικά κύτταρα που μελετώνται *in vitro* φαίνεται να είναι αθάνατα. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο απεριόριστος πολλαπλασιασμός είναι ένα χαρακτηριστικό που αποκτήθηκε *in vivo* και ήταν απαραίτητο για την ανάπτυξη του όγκου [7],[9],[18].

1.2.6 Μετάσταση

Σε κάποιο στάδιο κατά την ανάπτυξη του καρκίνου, θα γεννηθούν κύτταρα που καταλαμβάνουν γειτονικούς υγιείς ιστούς και μεταναστεύουν σε διάφορες περιοχές του σώματος όπου δημιουργούν αποικίες. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται μετάσταση [19].

Αυτή η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων τους επιτρέπει να εκμεταλλευτούν τον χώρο και τα θρεπτικά συστατικά των υγιών περιοχών του οργανισμού, μακριά από το αρχικό σημείο του όγκου, όπου η ζήτηση για αυτά είναι μεγάλη [7].

Τα καρκινικά κύτταρα που συμμετέχουν στη μετάσταση εμφανίζουν διαφοροποιήσεις στο σχήμα τους και στην πρόσδεσή τους στην εξωκυτταρική μήτρα. Μία βασική διαφορά είναι ότι χάνουν την πρωτεΐνη E-cadherin. Πρόκειται για μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που παίζει σημαντικό ρόλο στη σύζευξη μεταξύ των κυττάρων. Υψηλή έκφραση αυτής της πρωτεΐνης οδηγεί σε μείωση της μετάστασης, καθώς βοηθά στο να διατηρούνται τα κύτταρα συνδεδεμένα. Αντίθετα, μείωση της έκφρασής της ενισχύει φαινόμενα μετάστασης [20],[21].

1.2.7 Επαναπρογραμματισμός του μεταβολισμού

Η ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων απαιτεί, εκτός από την απορρύθμιση του πολλαπλασιασμού, και τροποποιήσεις του ενεργειακού μεταβολισμού. 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. Υπό αναερόβιες συνθήκες, μικρή ποσότητα του πυρουβικού καταλήγει στα μιτοχόνδρια, λόγω της έλλειψης οξυγόνου [22],[23]. Λόγω αυτού του φαινομένου, τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να αντισταθμίσουν την χαμηλότερη κατά 18 φορές παραγωγή ATP που αποδίδει η γλυκόλυση σε σχέση με την οξειδωτική φωσφορυλίωση που γίνεται στα μιτοχόνδρια. Αυτό το πετυχαίνουν μερικώς με υπερέκφραση υποδοχέων γλυκόζης, όπως ο GLUT1, γεγονός που αυξάνει την ποσότητα γλυκόζης που εισέρχεται στο κυτόπλασμα [24],[25],[26].

Ένα ενδιαφέρον στοιχείο είναι ότι μερικοί όγκοι περιέχουν δύο υποπληθυσμούς καρκινικών κυττάρων που διαφέρουν στα μονοπάτια παραγωγής ενέργειας. Ο ένας υποπληθυσμός αποτελείται από κύτταρα που εξαρτώνται από τη γλυκόζη και μέσω της γλυκόλυσης παράγουν γαλακτικό οξύ, ενώ τα κύτταρα του

δεύτερου υποπληθυσμού χρησιμοποιούν αυτό το γαλακτικό οξύ ως την κύρια πηγή ενέργειάς τους. Αυτοί οι δύο υποπληθυσμοί, λοιπόν, φαίνεται πως λειτουργούν συμβιωτικά: τα υποξικά καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν γλυκόζη ως «καύσιμο» και εκκρίνουν γαλακτικό οξύ το οποίο χρησιμοποιείται από τους για την παραγωγή ενέργειας από τους γείτονές τους που έχουν καλύτερη πρόσβαση σε οξυγόνο [27],[28],[29].

1.2.8 Διαφυγή από την απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος

Τα κύτταρα και οι ιστοί του σώματος παρακολουθούνται συνεχώς από το ανοσοποιητικό σύστημα και η ανοσολογική απόκριση που μπορεί να προκύψει 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. Έτσι, λοιπόν, και η διαφυγή της απόκρισης του ανοσοποιητικού συστήματος είναι ένα χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων [9].

Πρόσφατα, σε μία εργασία του Hanahan παρουσιάστηκαν 4 επιπλέον ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων [30].

1.3 Μικροπεριβάλλον καρκινικών κυττάρων

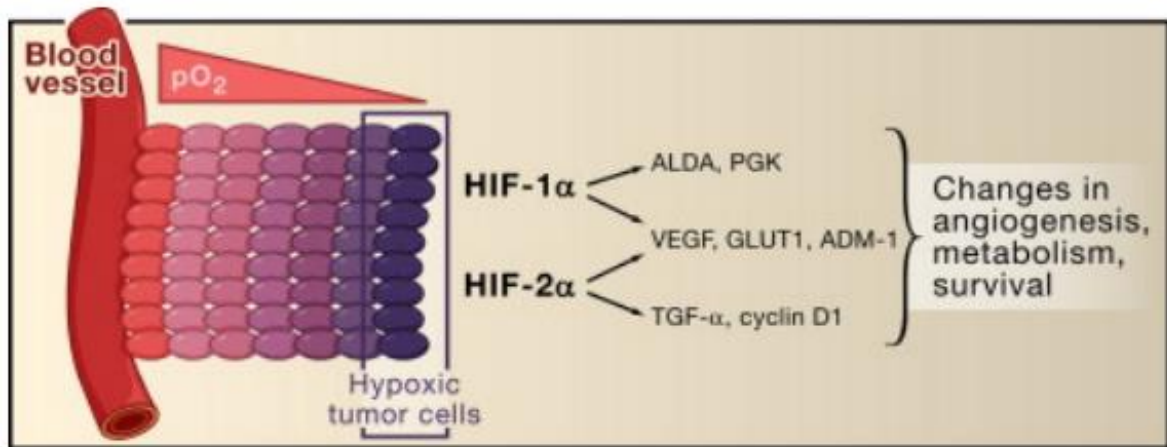
Ένας όγκος δεν είναι απλά μία ομάδα καρκινικών κυττάρων. Πρόκειται για ένα δίκτυο κυττάρων και παραγόντων που τον βοηθούν να αναπτύσσεται. Τα κύτταρα του όγκου ενεργοποιούν σημαντικές μοριακές και κυτταρικές αλλαγές στον οργανισμό για να εξασφαλίσουν κάλυψη των αναγκών τους και την ανάπτυξή τους. Το μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων χαρακτηρίζεται από διαρκείς αλλαγές και μεγάλη πολυπλοκότητα. Ανάμεσα σε διάφορα είδη καρκίνου μπορεί να εμφανίζονται διαφορές, αλλά υπάρχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά που θα αναλυθούν παρακάτω [31],[32].

1.3.1 Συνθήκες υποξίας

Στους γρήγορα αναπτυσσόμενους καρκινικούς ιστούς, η ανάγκη για οξυγόνο είναι μεγαλύτερη από την παροχή του. Επίσης, με τον συνεχή πολλαπλασιασμό και τη δημιουργία νέων καρκινικών κυττάρων μεγαλώνει η απόσταση από το αγγειακό σύστημα, γεγονός που εμποδίζει την αποτελεσματική διάχυση του οξυγόνου [32][33]. Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα επίπεδα οξυγόνου στα καρκινικά κύτταρα που χαρακτηρίζονται από υποξία είναι κατά 1%-2% χαμηλότερα σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Εδώ αξίζει να συμπληρωθεί ότι το αποτέλεσμα αυτό καθορίζεται από το μέγεθος και το στάδιο του όγκου, τα αρχικά επίπεδα οξυγόνου του ιστού και τη μέθοδο μέτρησης [34],[35].

Τα καρκινικά κύτταρα ανταποκρίνονται διαφορετικά στη μείωση του οξυγόνου, ανάλογα με το χρόνο που ήταν εκτεθειμένα στην υποξία. Οι συνθήκες υποξίας ενεργοποιούν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια στο κύτταρο, όπως το μονοπάτι του παράγοντα HIF (Hypoxia-inducible factor) [36]. Οι υπομονάδες (HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α) αυτού του παράγοντα είναι υπεύθυνες για την προσαρμογή των κυττάρων σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου. Σε επαρκώς οξυγονωμένα κύτταρα, η υπομονάδα HIF-1α υφίσταται αντίδραση υδροξυλίωσης από τα ένζυμα PHD και FIH-1 και έτσι «μαρκάρεται» ως HIF-1α-OH γεγονός που οδηγεί σε αποικοδόμησή της από το πρωτεάσωμα. Όταν τα επίπεδα οξυγόνου πέφτουν το ένζυμο PHD χάνουν την

ενεργότητά του και συνεπώς η υπομονάδα HIF-1α δεν αποικοδομείται [37]. Αφού, λοιπόν, δεν αποικοδομείται, μεταβαίνει στον πυρήνα, διμερίζεται με την υπομονάδα HIF-2β και το σύμπλοκο που προκύπτει προσδένεται στο DNA ενεργοποιώντας τη μεταγραφή γονιδίων σχετικών με την αγγειογένεση [38].

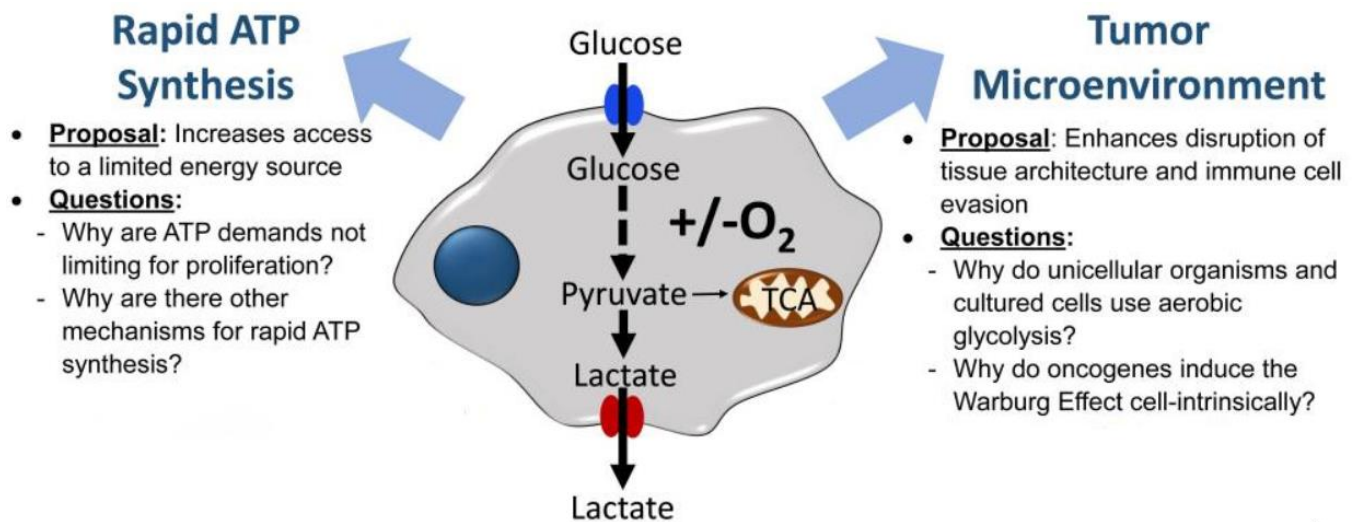


Εικόνα 4. Ο ρόλος του παράγοντα HIF στην εξέλιξη του καρκίνου [39]

1.3.2 Warburg effect

Ο μεταβολισμός της γλυκόζης, το βασικό θρεπτικό συστατικό για τα κύτταρα, οδηγεί στην παραγωγή ATP μέσω της οξείδωσης των δεσμών της. Αυτή η διαδικασία είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ζωής όλων των θηλαστικών. Στα φυσιολογικά κύτταρα το πρώτο προϊόν αυτής της διαδικασίας είναι το γαλακτικό οξύ ή ,μετά από πλήρη οξείδωση στα μιτοχόνδρια, το CO_2 . Στους όγκους ο ρυθμός πρόσληψης γλυκόζης αυξάνεται δραματικά και συνεπώς αυξάνεται και η ποσότητα του γαλακτικού οξέος που είναι προϊόν της γλυκόλυσης [40].

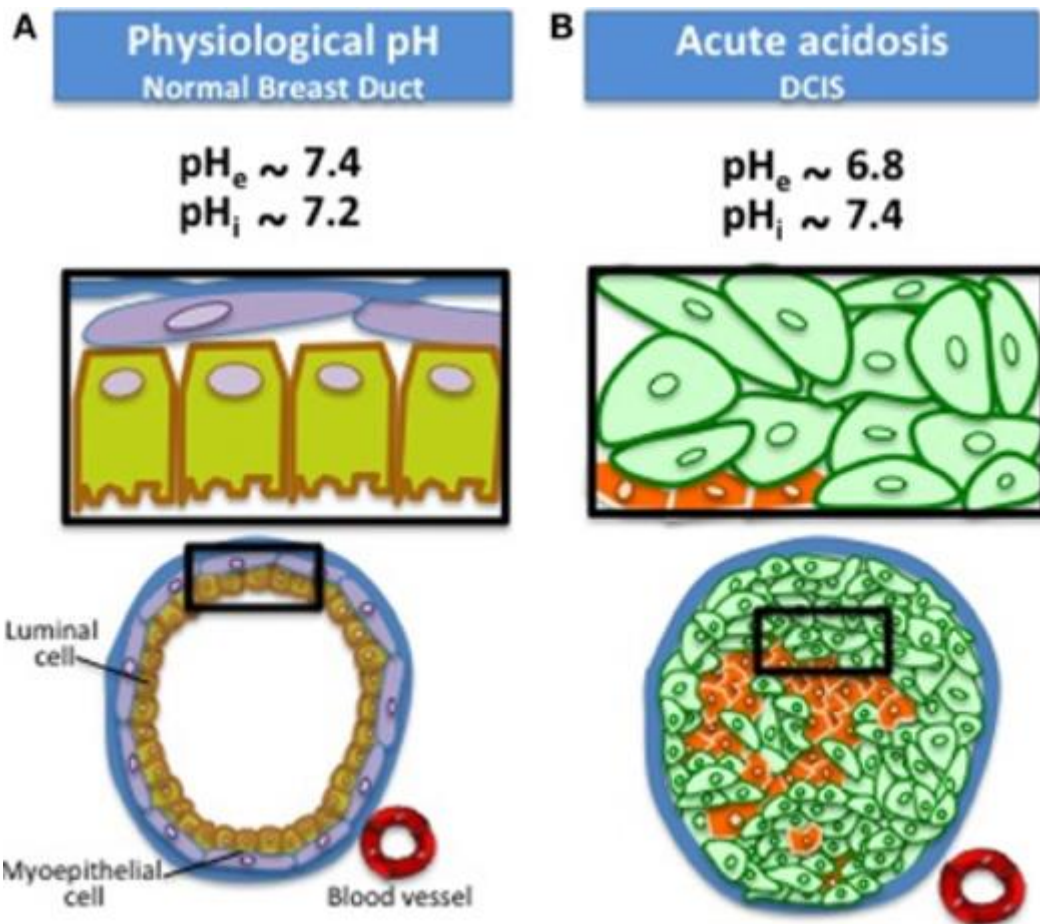
Ανά μονάδα γλυκόζης, η γλυκόλυση είναι λιγότερο αποτελεσματική όσον αφορά την παραγωγή ATP σε σχέση με τη μιτοχονδριακή αναπνοή. Ωστόσο, ο ρυθμός του μεταβολισμού της γλυκόζης μέσω της γλυκόλυσης είναι 10-100 φορές ταχύτερος σε σχέση με την πλήρη οξείδωσή της στα μιτοχόνδρια. Συνεπώς, η ποσότητα του ATP που παράγεται ανά πάσα στιγμή είναι συγκρίσιμη, ανεξάρτητα από το ποια διαδικασία ακολουθείται [40],[41].



εικόνα 5. Το φαινόμενο Warburg [40]

1.3.3 Όξινο περιβάλλον

Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα, τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν μεγαλύτερα επίπεδα μεταβολισμού και ταχύτερη ανάπτυξη. Ένα αποτέλεσμα αυτών των χαρακτηριστικών είναι η μείωση του εξωκυτταρικού pH των καρκινικών κυττάρων. Λόγω των αυξημένων ρυθμών γλυκόλυσης που παρατηρείται στους όγκους, αυξάνονται τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος. Τα καρκινικά κύτταρα αποβάλλουν το γαλακτικό οξύ για να ευνοηθεί ο μεταβολισμός και να αποφευχθεί η κυτταροτοξικότητα. Αυτό το γεγονός οδηγεί σε μείωση του εξωκυτταρικού pH τους. Η τιμή του εξωκυτταρικού pH των καρκινικών κυττάρων είναι περίπου 6,0 ενώ για τα φυσιολογικά κύτταρα η τιμή αυτή είναι περίπου 7,4 [42].



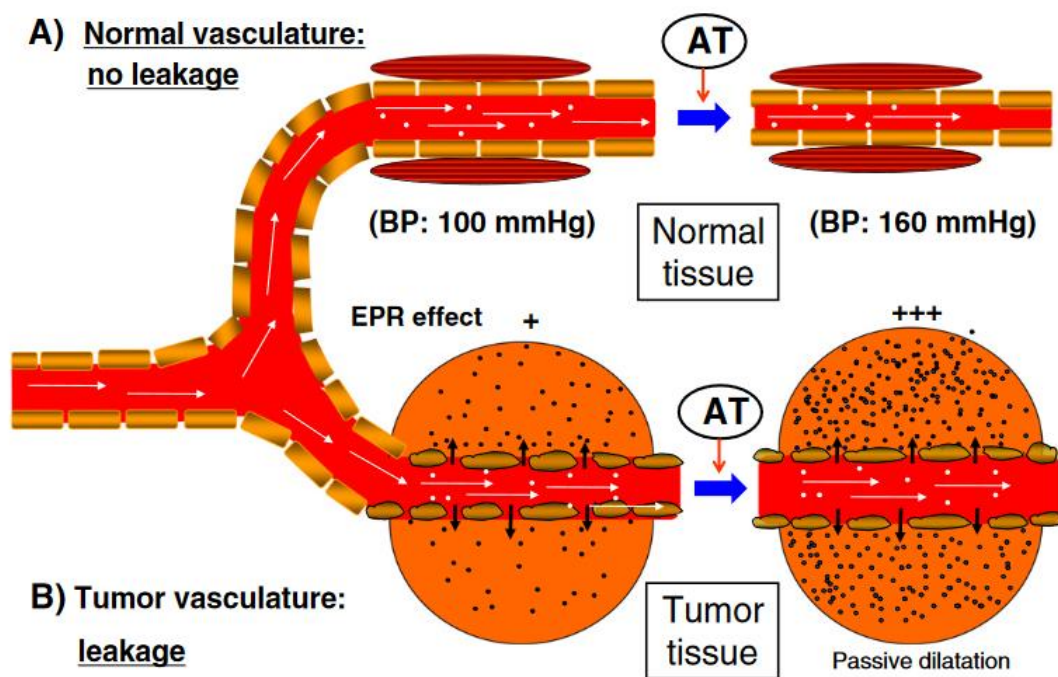
Εικόνα 6. Διαφορές στο pH ανάμεσα σε καρκινικά κύτταρα και υγιή κύτταρα [43]

1.3.4 Φαινόμενο αυξημένης διαπερατότητας και κατακράτησης

Έχει παρατηρηθεί ότι τα αγγεία των όγκων είναι διαπερατά σε μακρομοριακές ενώσεις. Αυτές οι ενώσεις, μετά την είσοδό τους στον ιστό του όγκου παγιδεύονται εκεί για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η παραπάνω παρατήρηση ονομάζεται φαινόμενο αυξημένης διαπερατότητας και κατακράτησης (EPR effect) [44].

Το φαινόμενο αυτό βασίζεται σε ορισμένα χαρακτηριστικά των όγκων, όπως:

- Η μαζική και ανώμαλη αγγειογένεση. Για να καλυφθούν οι αυξημένες ανάγκες σε οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά των καρκινικών κυττάρων, δημιουργούνται πυκνά και «ελαττωματικά» αιμοφόρα αγγεία, τα οποία είναι διαπερατά από θρεπτικά συστατικά και διάφορες ενώσεις [45].
- Η έλλειψη ενός αποτελεσματικού συστήματος λεμφικής αποστράγγισης στους όγκους. Αυτή η ανεπάρκεια έχει ως αποτέλεσμα την κατακράτηση μακρομορίων στους ιστούς των καρκινικών κυττάρων, γεγονός που δίνει τη δυνατότητα για στοχευμένες αντικαρκινικές θεραπείες [46],[47].



Εικόνα 7. Διαγραμματική απεικόνιση του φαινομένου EPR [48]

1.3.5 Ιξώδες

Το ιξώδες, μία σημαντική παράμετρος του μικροπεριβάλλοντος των ιστών, μπορεί να αποτελέσει δείκτη για τη διάγνωση του καρκίνου, λόγω της λειτουργίας του να ελέγχει διάφορες διαδικασίες και αντιδράσεις στο εσωτερικό των κυττάρων. Στα καρκινικά κύτταρα παρατηρείται αύξηση του ιξώδους. Μερικοί λόγοι που συντελούν σε αυτήν την παρατήρηση είναι:

- Η αυξημένη παραγωγή λέμφου στους ιστούς των όγκων [49].
- Η αυξημένη παραγωγή γαλακτικού οξέος λόγω των τροποποιήσεων στο μεταβολισμό τους.
- Τα υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών, ενζύμων και λιπιδίων που παρατηρούνται στα καρκινικά κύτταρα [50].

Μελέτες έχουν δείξει ότι υψηλές τιμές ιξώδους αυξάνουν την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων και συνεπώς ευνοούν τη μετάστασή τους [51].

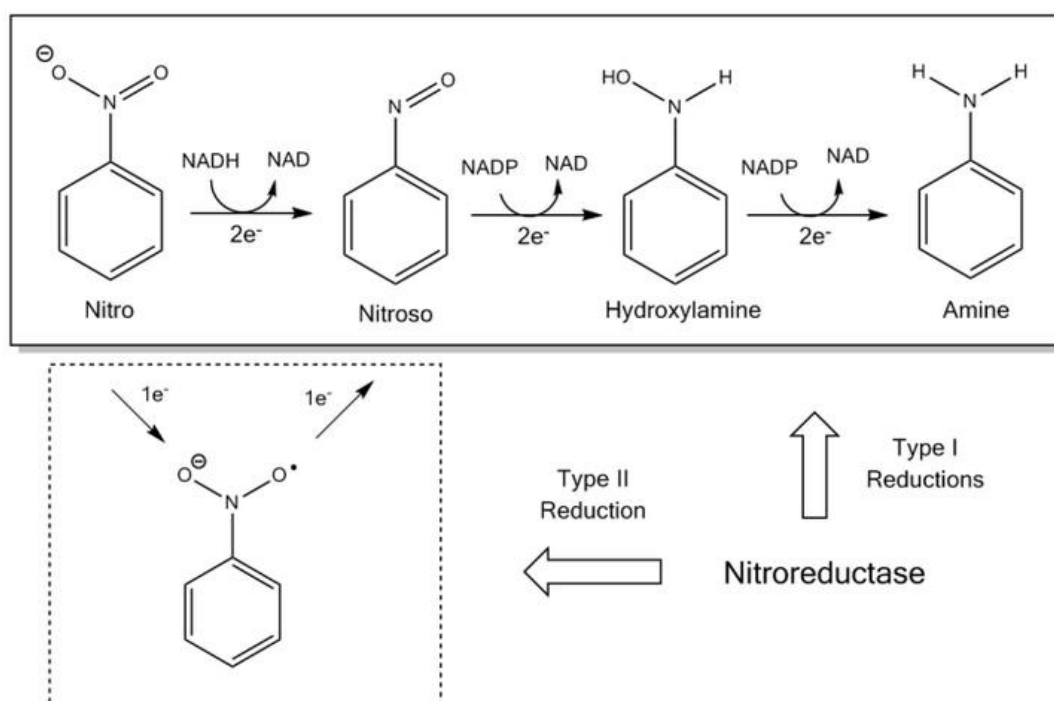
Έτσι, λοιπόν, είναι μεγάλη ανάγκη να χαρτογραφηθούν οι συνθήκες ιξώδους στο μικροπεριβάλλον των κυττάρων. Μία καινοτόμα τεχνική που χρησιμοποιείται για τον σκοπό αυτό είναι η απεικόνιση μέσω φθορισμού. Κύρια χαρακτηριστικά της είναι η εξαιρετική ευαισθησία, η υψηλή χρονική-χωρική ανάλυση και η διεκπεραίωσή της χωρίς επέμβαση στον ασθενή [52]. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναφερθεί πολλά βιοδραστικά φθοροφόρα μόρια που έχουν τη δυνατότητα να ανταποκρίνονται σε μεταβολές του ιξώδους μεταβάλλοντας τις φωτοφυσικές τους ιδιότητες [52],[53],[54],[55].

1.4 Υπερέκφραση νιτροαναγωγάσης

Οι νιτροαναγωγάσες (nitroreductase, NTR) είναι μια ομάδα φλαβινοπρωτεϊνών που καταλύουν την αναγωγή αρωματικών νιτρο-ενώσεων στις αντίστοιχες αμίνες, χρησιμοποιώντας είτε το NADH είτε το NADPH ως πηγή αναγωγικών ισοδυνάμων. Παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοαποκατάσταση και στην

αποικοδόμηση τοξικών οργανικών νιτρο-ενώσεων. Έχει παρατηρηθεί ότι σε συνθήκες υποξίας, όπως στην περίπτωση των όγκων, υπάρχει υπερέκφραση των ενδοκυτταρικών νιτροαναγωγασών [56],[57].

Υπάρχουν δύο είδη νιτροαναγωγασών: οι νιτροαναγωγάσες τύπου I που δεν είναι ευαίσθητες στο οξυγόνο και οι νιτροαναγωγάσες τύπου II που είναι ευαίσθητες στο οξυγόνο. Τα ένζυμα της πρώτης κατηγορίας προκαλούν αναγωγή δύο-ηλεκτρονίων των νιτρο-ομάδων προς τις αντίστοιχες αμίνες. Τα ένζυμα της δεύτερης κατηγορίας προκαλούν αναγωγή ενός-ηλεκτρονίου αρχικά και έπειτα προχωρούν σε ολοκλήρωση μόνο σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η μετατροπή της νιτρο ένωσης στο αντίστοιχο νιτρόσο-ανάλογο είτε μέσω των NTR τύπου I οι οποίες απαιτούν οξυγόνο για την αντίδραση αναγωγής είτε μέσω των NTR τύπου II οι οποίες πραγματοποιούνται αποκλειστικά απουσία οξυγόνου. Έπειτα, ακολουθούν δυο διαδοχικές αντιδράσεις αναγωγής αρχικά προς τον σχηματισμό του αναλόγου της υδροξυλαμίνης και στη συνέχεια αυτό της αμίνης [58].



Εικόνα 8. Απεικόνιση του μηχανισμού αναγωγής της νιτρο-ομάδας [58]

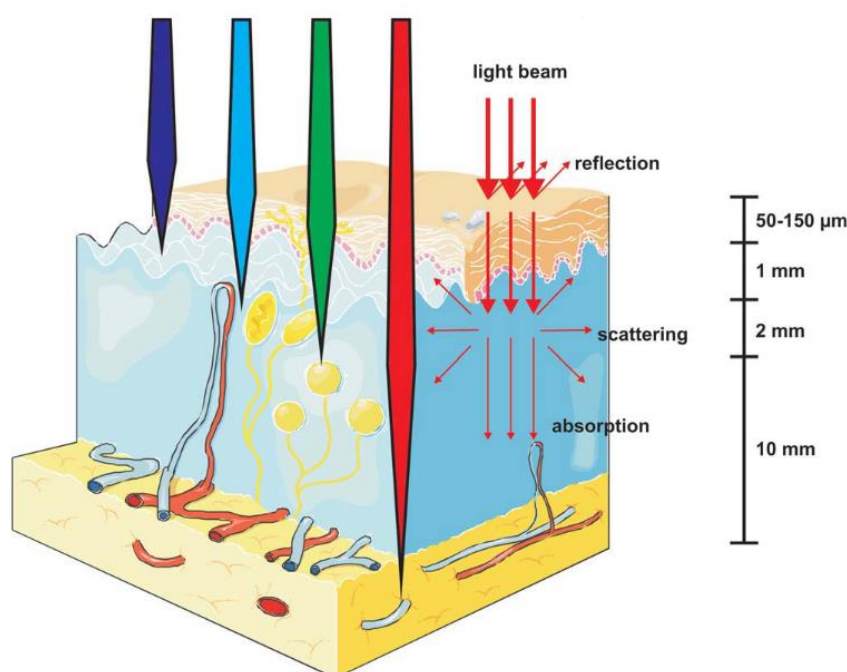
Η απεικόνιση μέσω φθορισμού είναι μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την παρακολούθηση βιοδραστικών μορίων σε ζωντανά συστήματα [59],[60]. Πρόκειται για μια διαδικασία ευαίσθητη, εκλεκτική και ταχεία. Πρόσφατα, η ανάπτυξη ενώσεων που ανιχνεύουν νιτροαναγωγάσες έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών. Οι ενώσεις αυτές έχουν σχεδιαστεί ώστε να λειτουργούν ως «διακόπτες». Κατά τη μετατροπή της νιτρο-ομάδας (που έλκει ηλεκτρόνια μέσω του συζυγιακού και του επαγωγικού φαινομένου) σε αμινο-ομάδα (που προσφέρει ηλεκτρόνια μέσω του συζυγιακού φαινομένου) παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές των φθοροφόρων ενώσεων. Πρόκειται για μία αποτελεσματική και εκλεκτική τεχνική [57].

1.5 Διάγνωση του καρκίνου και φθορισμός

Μία μεγάλη δοκιμασία που αντιμετωπίζει η επιστήμη της ογκολογίας είναι η καθιέρωση τεχνικών για τη γρήγορη και έγκυρη ανίχνευση του καρκίνου. Η επίτευξη αυτού θα αυξήσει τις πιθανότητες για επιτυχή αντιμετώπιση του όγκου και θα βελτιώσει τα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών [61]. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα για την ανίχνευση και τη διάγνωση του καρκίνου (μαγνητική τομογραφία, τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων, ακτίνες Χ, αξονική τομογραφία, υπέρηχοι) στερούνται ακρίβειας και ευαισθησίας. Επίσης, μπορεί να εγκυμονούν κινδύνους για την υγεία των ασθενών λόγω της ακτινοβολίας [62].

Οι τεχνικές οπτικής απεικόνισης προσφέρουν μία νέα προσέγγιση καθώς υπόσχονται μη-επεμβατική, άμεση και ακριβή ανίχνευση του όγκου. Τα σήματα που λαμβάνονται από αυτές τις τεχνικές προσφέρουν πληροφορίες για του ιστούς, τη δομή, την ανατομία, το μεταβολισμό και τη βιοχημεία των όγκων [63].

Η απεικόνιση μέσω φθορισμού στην περιοχή του εγγύς υπερύθρου (Near-Infrared, NIR, 700-1000 nm) έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών λόγω της βαθύτερης διείσδυσης που επιτυγχάνεται σε αυτήν την περιοχή μηκών κύματος. Αυτό συμβαίνει γιατί στο διάστημα μεταξύ των 700-1000 nm τα κύρια μόρια που απορροφούν ακτινοβολία (αιμοσφαιρίνη, νερό, μελανίνη) έχουν μικρές τιμές απορρόφησης [64].

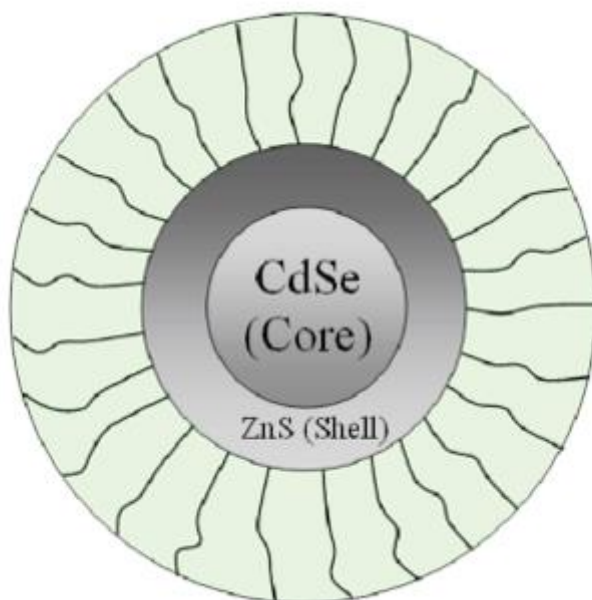


Εικόνα 9. Η διείσδυση του φωτός στους ιστούς. Το κόκκινο φως που αντιστοιχεί στην περιοχή του NIR φτάνει σε μεγαλύτερο βάθος μέσα στο σώμα [65]

Για να είναι επιτυχημένη η απεικόνιση μέσω φθορισμού στην περιοχή του εγγύς υπερύθρου, απαιτείται η σύνθεση ενώσεων με συγκεκριμένες φωτοφυσικές ιδιότητες. Το ιδανικό NIR ανάλογο πρέπει να διαθέτει μεγάλα Stokes Shifts (για ελαχιστοποίηση της παρεμβολής των φασμάτων απορρόφησης και εκπομπής), υψηλό συντελεστή μοριακής απορρόφησης, υψηλή κβαντική απόδοση, χημική και φωτοφυσική σταθερότητα σε διαλύτες και βιολογικές συνθήκες και καλή διαλυτότητα στο νερό [66].

Τα ανάλογα εγγύς υπερύθρου που χρησιμοποιούνται χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τα ανόργανα και τα οργανικά.

Τα ανόργανα ανάλογα περιλαμβάνουν τις κβαντικές κουκίδες και άλλα νανοσωματίδια. Αυτές οι δομές αναδύθηκαν γρήγορα ως φθοροφόρα για την απεικόνιση βιολογικών δειγμάτων *in vitro* και *in vivo*. Ωστόσο, οι βιολογικές τους εφαρμογές έχουν «παγώσει» λόγω τεχνικών δυσκολιών, όπως η ακριβή παραγωγή τους και η πιθανή κυτταροτοξικότητα από τα βαρέα μέταλλα που χρησιμοποιούνται (Cd, Se) [67].



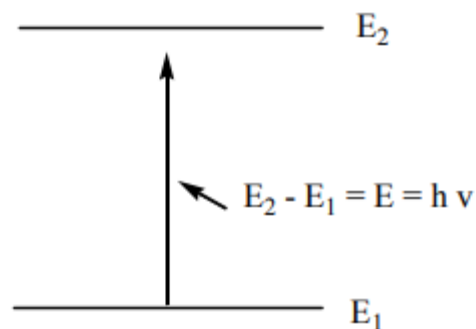
Εικόνα 10. Quantum dot [68]

Τα οργανικά ανάλογα, σε σχέση με τα ανόργανα, μοιάζουν πιο ελκυστικά καθώς είναι απαλλαγμένα από ορισμένες δυσκολίες, όπως το κόστος και η σύνθεση σε μεγάλη κλίμακα [69],[70]. Επίσης, δίνουν τη δυνατότητα για εύκολη σύνδεση με αμινοξέα, πρωτεΐνες, νουκλεοτίδια και αντισώματα για εξειδικευμένη κατεύθυνση της διαδικασίας [71],[72].

1.6 Φασματοσκοπία απορρόφησης και φασματοσκοπία φθορισμού

Για την απεικόνιση και τη πιθανή θεραπεία καρκινικών κυττάρων, σκοπός στις περισσότερες περιπτώσεις είναι η σύνθεση ενός υποστρώματος που αντιδρά εκλεκτικά με κάποιο βιοδείκτη ή χαρακτηριστικό στο μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων και δίνει κάποιο σήμα για την ανίχνευση του όγκου. Πριν τη σύνθεση ενός τέτοιου υποστρώματος, είναι απαραίτητη η μελέτη των φωτοφυσικών χαρακτηριστικών του, της **φασματοσκοπίας UV-Vis** και της **φασματοσκοπίας φθορισμού**.

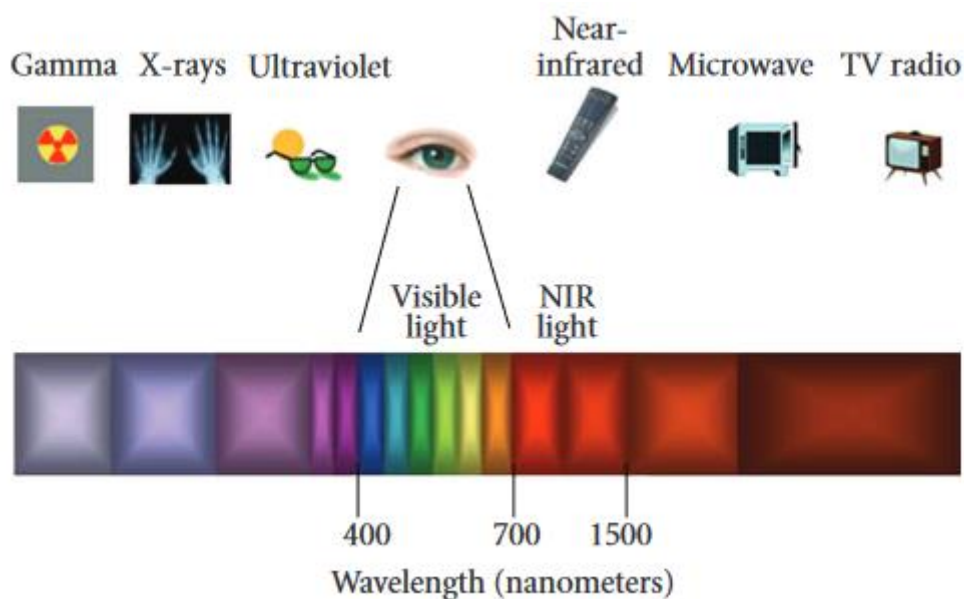
Ο μηχανισμός που εξηγεί τα φαινόμενα απορρόφησης ακτινοβολίας, περιλαμβάνει την απορρόφηση συγκεκριμένων ποσών ενέργειας. Η ενέργεια που απαιτείται για τη μετάβαση από μία χαμηλότερη ενεργειακά στάθμη (E1) σε μία υψηλότερη ενεργειακά στάθμη (E2) είναι ακριβώς ίση με το ποσό ενέργειας της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που προκαλεί τη μετάβαση [73].



Εικόνα 11. Μετάβαση από την ενεργειακή στάθμη E_1 στην ενεργειακή στάθμη E_2 [73]

$E = h\nu = hc / \lambda$, όπου E είναι η ενέργεια της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που απορροφάται, h είναι η σταθερά του Planck, ν είναι η συχνότητα του φωτός σε hertz, c είναι η ταχύτητα του φωτός και λ το μήκος κύματος σε cm.

Όπως βλέπουμε και από την εξίσωση, η Ενέργεια (E) είναι ανάλογη με τη συχνότητα (ν) και αντιστρόφως ανάλογη με το μήκος κύματος (λ). Σε ένα φάσμα, όσο μετακινούμαστε από την κοσμική ακτινοβολία στην περιοχή του υπερύθρου και από εκεί στις ραδιοσυχνότητες, μεταβαίνουμε σε περιοχές χαμηλότερης ενέργειας.



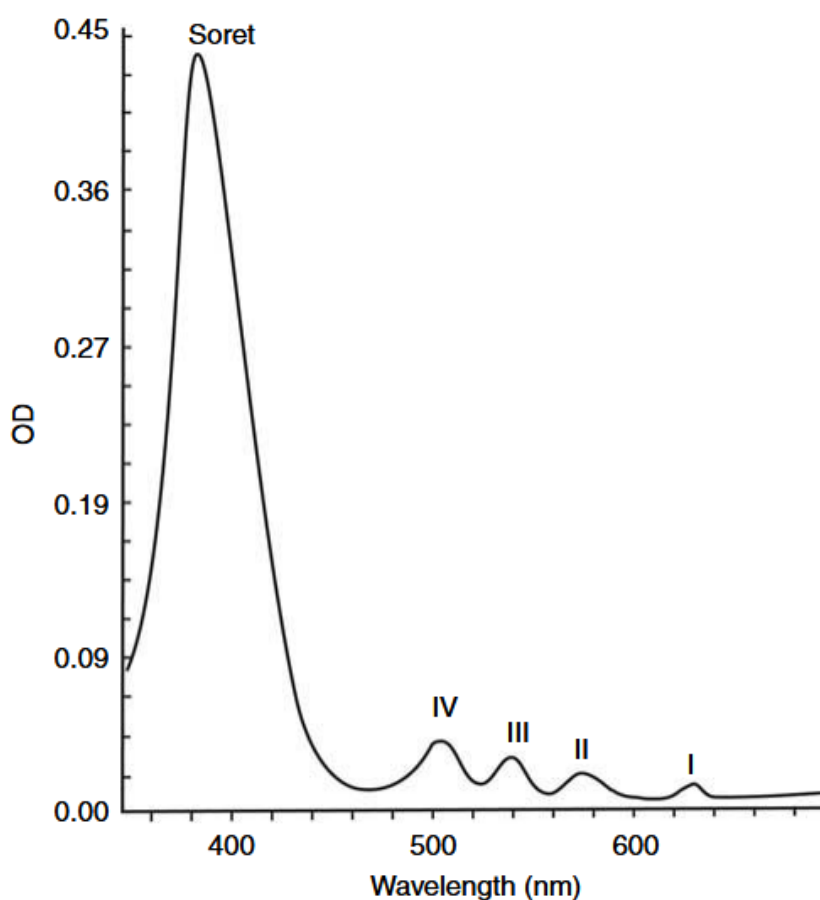
Εικόνα 12. Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα [74]

Η φασματοσκοπία ορατού–υπεριώδους ($\lambda=200-800$ nm) μελετά τις αλλαγές στην ηλεκτρονιακή κατάσταση των μορίων, που προκύπτουν λόγω μεταφοράς ηλεκτρονίων από π- ή μη-δεσμικά τροχιακά. Συνήθως, προσφέρει πληροφορίες για π-ηλεκτρονιακά συστήματα, αρωματικές ενώσεις κ.ά.

Αυτή η φασματοσκοπία απορρόφησης χρησιμοποιεί ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μεταξύ 190 και 800 nm και χωρίζεται σε δύο περιοχές: το υπεριώδες (190-400 nm) και το ορατό (400-800 nm). Οι μετρήσεις

απορρόφησης γίνονται σε πολύ αραιωμένα διαλύματα της ένωσης προς μελέτη και απαιτούν μεγάλη προσοχή στην επιλογή του διαλύτη. Ο διαλύτης δεν θα πρέπει να απορροφά στην περιοχή μηκών κύματος που εξετάζεται [73].

Ένα φάσμα απορρόφησης είναι αποτέλεσμα ηλεκτρονιακών, δονητικών και περιστροφικών μεταβάσεων. Η κορυφή του φάσματος αντιστοιχεί στην ηλεκτρονική μετάβαση, και το υπόλοιπο φάσμα σχηματίζεται από τις περιστροφικές και δονητικές μεταβάσεις. Έτσι, λοιπόν, τα φάσματα απορρόφησης είναι ευαίσθητα στη θερμοκρασία. Η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει τις περιστροφικές και τις δονητικές καταστάσεις των μορίων και οδηγεί σε διεύρυνση του φάσματος. Η ένταση του φάσματος απορρόφησης εξαρτάται, μεταξύ άλλων, από τον πληθυσμό των μορίων που φτάνουν στη διεγερμένη κατάσταση. Όσο μεγαλύτερος είναι αυτός ο πληθυσμός, τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η ένταση [75].



Εικόνα 13. Φάσμα απορρόφησης της πρωτοπορφυρίνης ΙΧ σε DMSO [75]

1.6.1 Επίδραση του περιβάλλοντος στο φάσμα απορρόφησης

Το περιβάλλον μπορεί να περιλαμβάνει τη θερμοκρασία, το διαλύτη, πιθανές αλληλεπιδράσεις του χρωμοφόρου με άλλα μόρια κ.ά. Γενικά, οι αλληλεπιδράσεις του χρωμοφόρου με μόρια του διαλύτη πραγματοποιούνται μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου. Αν ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι αρκετά πολικός, τότε οι αλληλεπιδράσεις διπόλου – διπόλου απαιτούν μεγάλα ποσά ενέργειας και συνεπώς η θέση της κορυφής θα βρίσκεται σε χαμηλά μήκη κύματος. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιούνται λιγότερο πολικοί διαλύτες, οι αλληλεπιδράσεις διπόλου – διπόλου είναι πιο ασθενείς

και απαιτείται λιγότερη ενέργεια για να συμβεί η απορρόφηση, άρα η κορυφή βρίσκεται σε υψηλότερα μήκη κύματος. Όταν μία κορυφή απορρόφησης μετατοπίζεται σε χαμηλά μήκη κύματος τότε λέμε ότι έχουμε υψοχρωμική μετατόπιση, ενώ όταν συμβαίνει το αντίθετο έχουμε βαθυχρωμική μετατόπιση [75].

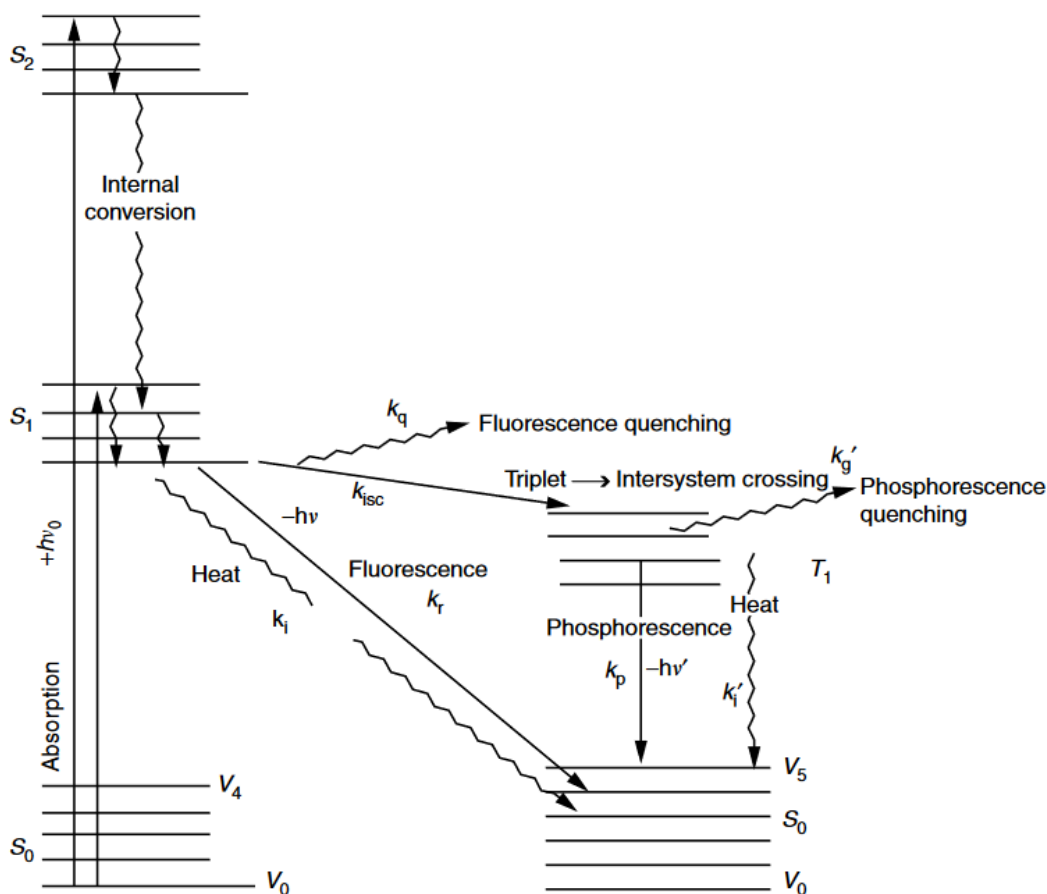
1.6.2 Φθορισμός

Η απορρόφηση φωτός από ένα μόριο προκαλεί τη μετάβαση ηλεκτρονίων από τη θεμελιώδη ενεργειακή κατάσταση S_0 σε μία διεγερμένη κατάσταση S_n . Η αποδιέγερση από την S_n στην S_0 θα γίνει μέσα από δύο βήματα:

1. Το μόριο επιστρέφει από την S_n στη χαμηλότερη διεγερμένη στάθμη S_1 διαχέοντας ενέργεια στο περιβάλλον. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται εσωτερική μετατροπή.
2. Από τη διεγερμένη στάθμη S_1 το μόριο θα επιστρέψει στη θεμελιώδη κατάσταση S_0 μέσω των παρακάτω ανταγωνιστικών διαδικασιών:
 - Εκπομπή ενός φωτονίου (**φθορισμός**)
 - Διάχυση μέρους της ενέργειας στο περιβάλλον ως θερμότητα
 - Μεταφορά ενέργειας σε γειτονικά μόρια
 - Μετάβαση σε μία τριπλή διεγερμένη κατάσταση T_1 (χαμηλότερης ενέργειας από την S_1). Για κάθε διεγερμένη κατάσταση S υπάρχει μία τριπλή κατάσταση T χαμηλότερης ενέργειας

Η αποδιέγερση από την τριπλή κατάσταση συμβαίνει, επίσης, μέσω ανταγωνιστικών διαδικασιών:

- Εκπομπή ενός φωτονίου (**φωσφορισμός**)
- Διάχυση ενέργειας στο περιβάλλον ως θερμότητα
- Μεταφορά ενέργειας σε γειτονικά μόρια



εικόνα 14. Διάγραμμα Jablonski. Ονομάζεται, επίσης, και διάγραμμα ηλεκτρονικών μεταπτώσεων [76]

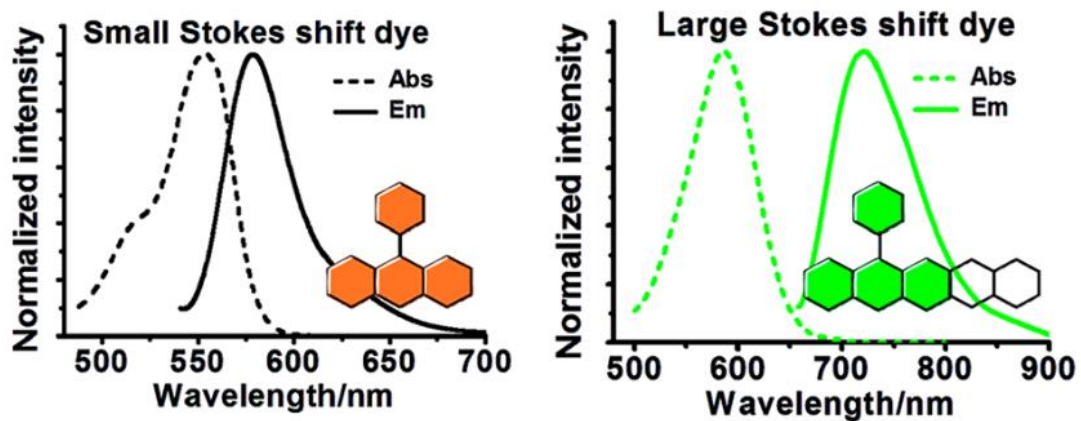
Ένα χρωμοφόρο που εκπέμπει ένα φωτόνιο ονομάζεται φθοροφόρο. Δεν είναι απαραίτητο ότι όλα τα χρωμοφόρα θα φθορίζουν. Η αποδιέγερση τους μπορεί να συμβαίνει με διάχυση της ενέργειας ως θερμότητα ή με μεταφορά της σε μόρια του διαλύτη. Για παράδειγμα, η αίμη απορροφά ακτινοβολία, αλλά δεν φθορίζει. Αυτό συμβαίνει γιατί η ενέργεια διέγερσης μεταφέρεται από την πορφυρίνη στο σίδηρο.

Η απορρόφηση και ο φθορισμός δεν απαιτούν μεταβολή του spin, ενώ ο φωσφορισμός απαιτεί. Επομένως, η απορρόφηση και ο φθορισμός είναι πολύ ταχύτερες διαδικασίες από το φωσφορισμό. Οι ενδεικτικές τιμές χρόνου για τη διάρκειά τους είναι:

- Απορρόφηση: 10^{-15} s
- Φθορισμός: 10^{-9} s
- Φωσφορισμός: από milliseconds μέχρι και μερικά λεπτά

Όπως αναφέρεται παραπάνω, υπάρχουν διάφορες ανταγωνιστικές διαδικασίες για την αποδιέγερση ενός μορίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η ενέργεια απορρόφησης να είναι μεγαλύτερη από την ενέργεια εκπομπής, αφού ένα μέρος της δεύτερης μεταφέρεται στο περιβάλλον ως θερμότητα ή σε μόρια του διαλύτη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το μήκος κύματος εκπομπής να είναι μεγαλύτερο από το μήκος κύματος

διέγερσης. Αυτή η διαφορά των δύο φασμάτων (διέγερσης και εκπομπής) ονομάζεται μετατόπιση Stokes (Stokes shift) [76].



Εικόνα 15. Παράδειγμα μικρού Stokes shift (αριστερά) και μεγάλου Stokes shift (δεξιά) [77]

1.6.3 Επίδραση διαλύτη

Στη θεμελιώδη κατάσταση οι διπολικές ροπές των μορίων του διαλύτη και του φθοροφόρου αλληλεπιδρούν και τα μόρια του διαλύτη κατανέμονται κατάλληλα γύρω από το φθοροφόρο. Μετά την απορρόφηση ακτινοβολίας, το διεγερμένο φθοροφόρο έχει διαφορετική διπολική ροπή και οι αλληλεπιδράσεις με τα μόρια του διαλύτη είναι πλέον ασταθείς. Για να επιτευχθεί, λοιπόν, σταθερότητα τα διεγερμένα μόρια του φθοροφόρου θα χρησιμοποιήσουν μέρος της ενέργειας που απορρόφησαν για την επαναδιάταξη των διπολικών ροπών των μορίων του διαλύτη. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται δονητική χαλάρωση. Η εκπομπή προκύπτει μετά τη δονητική χαλάρωση.

Σε ένα πολικό μέσο τα διεγερμένα μόρια χρησιμοποιούν ενέργεια για την επαναδιάταξη της διπολικής ροπής των μορίων του διαλύτη. Σε ένα άπολο μέσο τα διεγερμένα μόρια χρησιμοποιούν ενέργεια ώστε να προκαλέσουν την πόλωση των μορίων του διαλύτη. Η δεύτερη διαδικασία απαιτεί λιγότερη ενέργεια από την πρώτη και για αυτόν το λόγο τα φάσματα εκπομπής σε πολικά μέσα μετατοπίζονται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος [76].

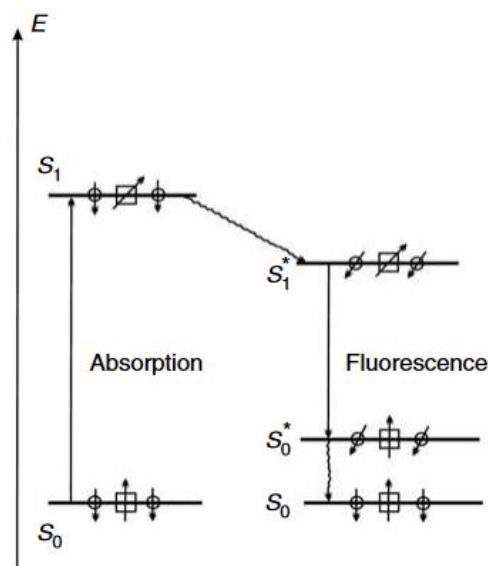


Figure 7.18 Relationship between fluorescence emission and dipole orientation. Squares characterize fluorophore dipole and circles solvent dipole.

Εικόνα 16. Σχέση μεταξύ του φθορισμού και της διευθέτησης των διπόλων. Τα τετράγωνα απεικονίζουν τη διπολική ροπή του φθοροφόρου και οι κύκλοι τη διπολική ροπή του διαλύτη [76]

1.6.4 Φαινόμενα φθορισμού

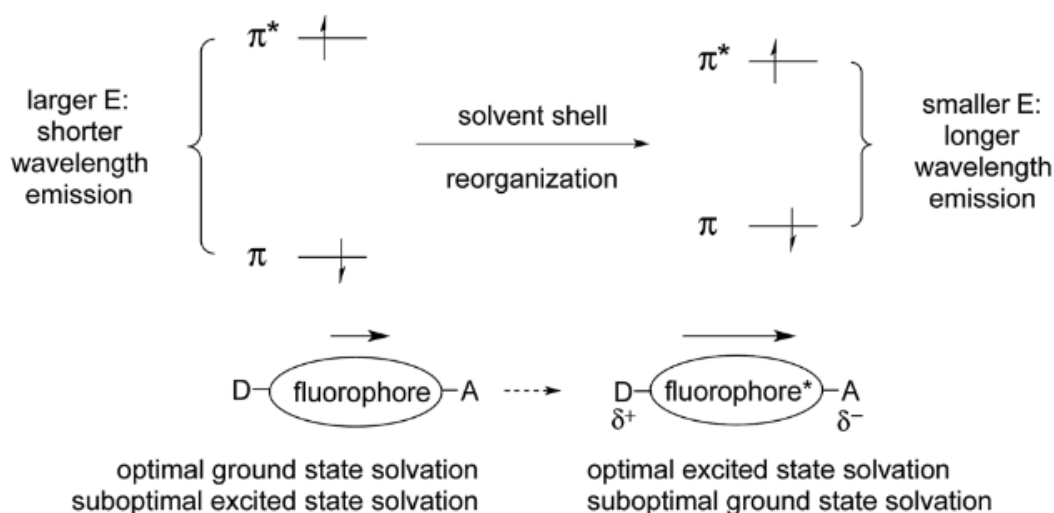
1.6.4.1 Ενδομοριακή μεταφορά φορτίου (Intramolecular charge transfer, ICT)

Η ενδομοριακή μεταφορά φορτίου (ICT) είναι ένας από τους πιο συνηθισμένους μηχανισμούς που αξιοποιείται κατά το σχεδιασμό ενώσεων που φθορίζουν. Τα φθοροφόρα που ακολουθούν αυτόν το μηχανισμό έχουν, συνήθως, μία ομάδα δότη ηλεκτρονίων στο ένα μέρος του μορίου και μία ομάδα δέκτη ηλεκτρονίων στο άλλο μέρος του μορίου.

Τα μόρια αυτά, εμφανίζουν συνήθως ισχυρότερη διπολική ροπή στη διεγερμένη κατάσταση σε σχέση με τη θεμελιώδη. Αυτό σημαίνει ότι η επιδιαλύτωση των φθοροφόρων μορίων από μόρια του διαλύτη πρέπει να αλλάξει. Η διεγερμένη κατάσταση διαρκεί αρκετά ώστε να συμβεί αυτή η αναδιάταξη και να βελτιστοποιηθεί η επιδιαλύτωση. Αυτή η διαδικασία μειώνει την ενέργεια της διεγερμένης κατάστασης. Έπειτα ακολουθεί η εκπομπή φθορισμού, η οποία όμως είναι αρκετά γρήγορη ώστε να μην υπάρχει χρόνος για την επαναδιάταξη των μορίων του διαλύτη όταν το φθοροφόρο επιστρέφει στη θεμελιώδη κατάσταση. Έτσι, σχηματίζεται μία θεμελιώδης κατάσταση που δε διαθέτει την καλύτερη δυνατή επιδιαλύτωση και συνεπώς είναι πιο ασταθής (μεγαλύτερη ενέργεια). Με αυτόν τον τρόπο οδηγούμαστε σε εκπομπή σε μεγαλύτερα μήκη κύματος [78].



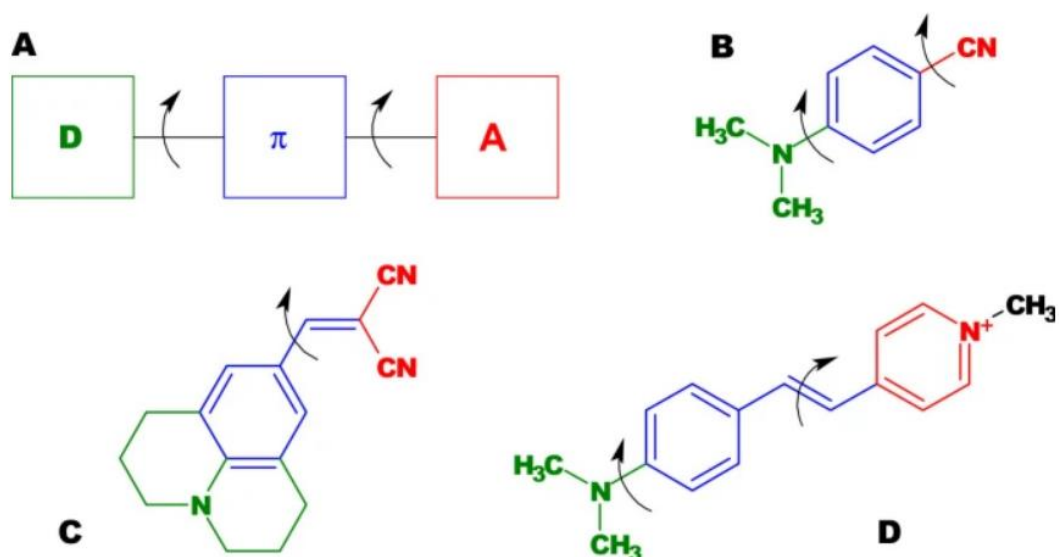
Fig. 5 Increase in dipole moment upon excitation to the excited state.



Εικόνα 17. Ενεργειακό διάγραμμα που σχετίζει το ICT με τη διαλυτόλυση σε πολικά συστήματα [78]

1.6.4.2 Περιστρεφόμενη ενδομοριακή μεταφορά φορτίου (Twisted intramolecular charge transfer, TICT)

Ο όρος *μοριακός ρότορας* συνήθως χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα φθορίζον μόριο που διαθέτει τη δυνατότητα να υποβληθεί σε ενδομοριακή περιστροφική κίνηση όταν βρίσκεται στη διεγερμένη κατάσταση. Ένας μοριακός ρότορας αποτελείται από τρεις διακριτές υπομονάδες: μία ομάδα-δότη ηλεκτρονίων, μία ομάδα-δέκτη ηλεκτρονίων και ένα συνδέτη πλούσιο σε ηλεκτρόνια που αποτελείται από εναλλασσόμενους απλούς και διπλούς δεσμούς. Μέσω του συνδέτη, ο δότης και ο δέκτης ηλεκτρονίων βρίσκονται σε συζυγία και επιτρέπεται η μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ τους. Το μόριο αντιδρά στην διέγερση μέσω ακτινοβολίας με μία ενδομοριακή μεταφορά φορτίου από το δότη στον δέκτη. Όταν, όμως, οι τρεις υπομονάδες βρίσκονται σε επίπεδη ή σχεδόν επίπεδη διαμόρφωση στη θεμελιώδη κατάσταση, ηλεκτροστατικές δυνάμεις επάγουν την ενδομοριακή περιστροφική κίνηση των υπομονάδων. Έτσι, το μόριο υιοθετεί μία μη-επίπεδη διαμόρφωση με χαμηλότερης ενέργειας διεγερμένη κατάσταση. Η αποδιέγερση από αυτή οδηγεί σε φθορισμό μετατοπισμένο σε μεγαλύτερα μήκη κύματος [79].



Εικόνα 18. Γενικές δομές μοριακού ρότορα, όπου απεικονίζονται οι δότες ηλεκτρονίων (πράσινο), οι δέκτες ηλεκτρονίων (κόκκινο) και ο πλούσιος σε ηλεκτρόνια συνδέτης που τα διαχωρίζει [79]

1.7 Συμβατικές τεχνικές αντιμετώπισης του καρκίνου και ανάπτυξη αναστολέων

Παρά την ανάπτυξη διαφόρων θεραπειών, εκατομμύρια ασθενείς χάνουν τη ζωή τους ετησίως. Αυτό κυρίως οφείλεται στη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων, στην ανθεκτικότητά τους στις υπάρχουσες θεραπείες, στην ικανότητά τους να αποφεύγουν τις απαντήσεις του ανοσοποιητικού συστήματος και στην επανεμφάνιση των όγκων μετά από ανεπαρκή αφαίρεσή τους [80].

Οι πιο διαδεδομένες θεραπείες για τον καρκίνο είναι η χημειοθεραπεία, η εγχείρηση και η ραδιοθεραπεία.

1.7.1 Χημειοθεραπεία

Η χημειοθεραπεία βασίζεται στη χορήγηση ενός ή περισσότερων φαρμακευτικών ενώσεων στους ασθενείς οι οποίες είναι τοξικές για τα κύτταρα και οδηγούν έτσι στην καταστολή των όγκων. Όμως, οι θεραπευτικές ενώσεις πολλές φορές δεν συσσωρεύονται αποκλειστικά στις περιοχές των όγκων, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο βλάβες σε υγιή κύτταρα του οργανισμού. Επίσης, τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν σε κάποιο βαθμό ανθεκτικότητα στα χορηγούμενα φάρμακα (μειωμένη πρόσληψη, μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA) [81]. Τέλος, η αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας επηρεάζεται και από τον μεταβολισμό των φαρμάκων από βακτήρια που βρίσκονται στους όγκους. Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι σε καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος υπάρχουν βακτήρια του γένους *Proteobacteria*. Αυτά παράγουν ένα ένζυμο, την απαμινάση της κυτιδίνης, που αδρανοποιεί τη φαρμακευτική ένωση γεμισιταβίνη [82],[83].

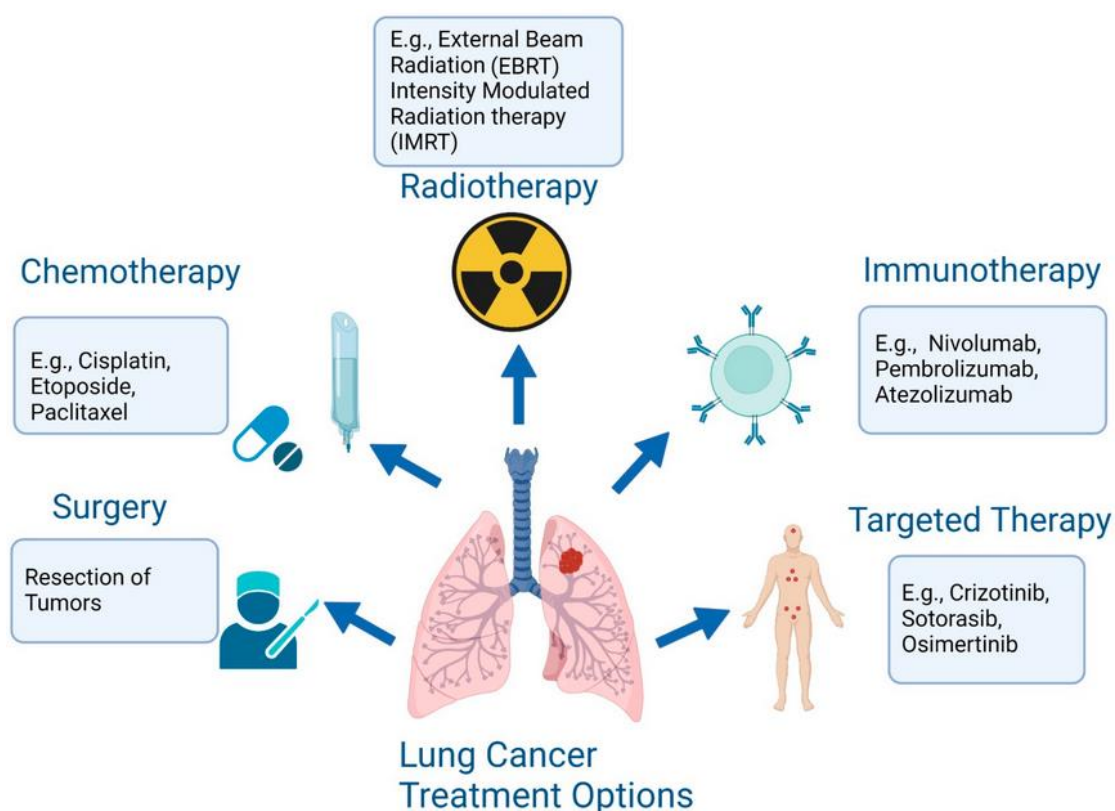
1.7.2 Χειρουργική επέμβαση

Η εγχείρηση είναι η παλαιότερη θεραπεία για τον καρκίνο και εφαρμόζεται στο 60% των ασθενών είτε ως αποκλειστική θεραπεία είτε σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία ή ραδιοθεραπεία. Είναι πιο αποδοτική όταν ο καρκίνος δεν έχει εξαπλωθεί σε άλλα σημεία του σώματος και επιδιώκει την ποσοτική αφαίρεση

των όγκων [84]. Σε αυτή τη διαδικασία, όμως, απαιτείται λεπτομερής ακρίβεια ώστε να μην επηρεαστούν υγιή κύτταρα του οργανισμού και να μην αφεθούν υπολείμματα καρκινικών κυττάρων που θα οδηγήσουν στην επανεμφάνιση του όγκου [85].

1.7.3 Ραδιοθεραπεία

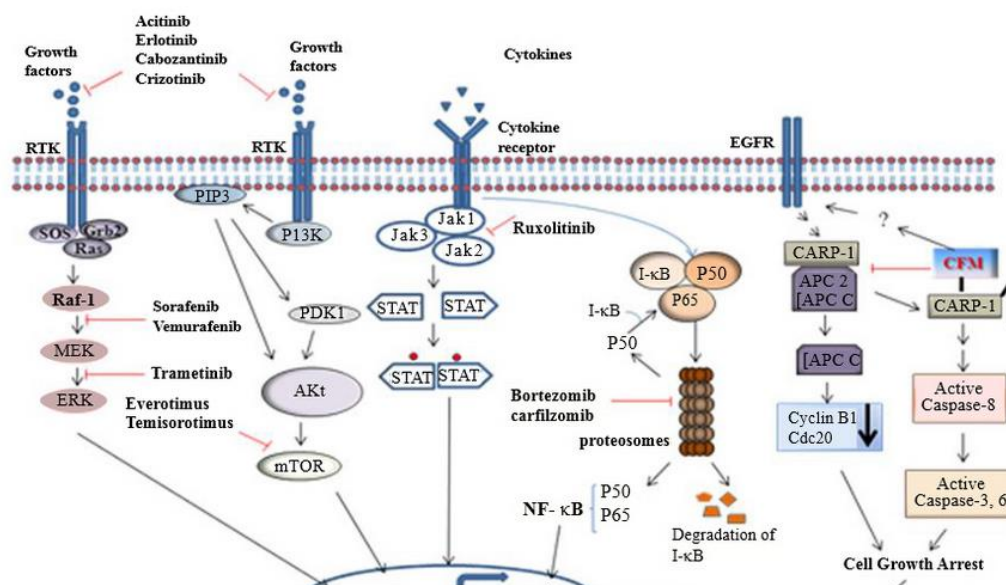
Η εφαρμογή της ραδιοθεραπείας βασίζεται στην επίδραση ιονίζουσας ακτινοβολίας στα καρκινικά κύτταρα. Η ακτινοβολία προκαλεί βλάβες στο γενετικό υλικό των κυττάρων-στόχων, με αποτέλεσμα να χάνεται η ικανότητα πολλαπλασιασμού ή να επάγεται η καταστροφή τους [86],[87]. Κατά τη θεραπεία, όμως, ίσως επηρεαστούν και υγιή κύτταρα και παράλληλα μπορεί να προκληθούν δυσάρεστες παρενέργειες στον οργανισμό [88].



Εικόνα 19. Θεραπείες για το καρκίνο [89]

Για να αντιμετωπιστούν τα μειονεκτήματα των παραδοσιακών αντικαρκινικών θεραπειών, γίνονται προσπάθειες για την ανάπτυξη μορίων που θα «εξοντώνουν» στοχευμένα τα καρκινικά κύτταρα. Αυτή η προσέγγιση είναι σαφώς πιο εκλεκτική από τις ήδη υπάρχουσες θεραπείες. Προς το παρόν υπάρχουν δύο καινοτόμες θεραπείες που ακολουθούν αυτό το σκεπτικό: οι αναστολείς μικρού μοριακού βάρους και τα μονοκλωνικά αντισώματα. Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι συνήθως πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους (150kDa) και αλληλεπιδρούν μόνο με υποδοχείς που εκφράζονται στη μεμβράνη των κυττάρων, ενώ οι αναστολείς μικρού μοριακού βάρους κυμαίνονται περίπου στα 500Da και είναι εύκολο να διαπεράσουν τις μεμβράνες των κυττάρων. Επίσης, η παραγωγή τους είναι πιο οικονομική και η χρήση τους μπορεί να γίνει και μέσω του στόματος, σε αντίθεση με τα μονοκλωνικά αντισώματα που περιορίζονται σε ενδοφλέβια χρήση [90].

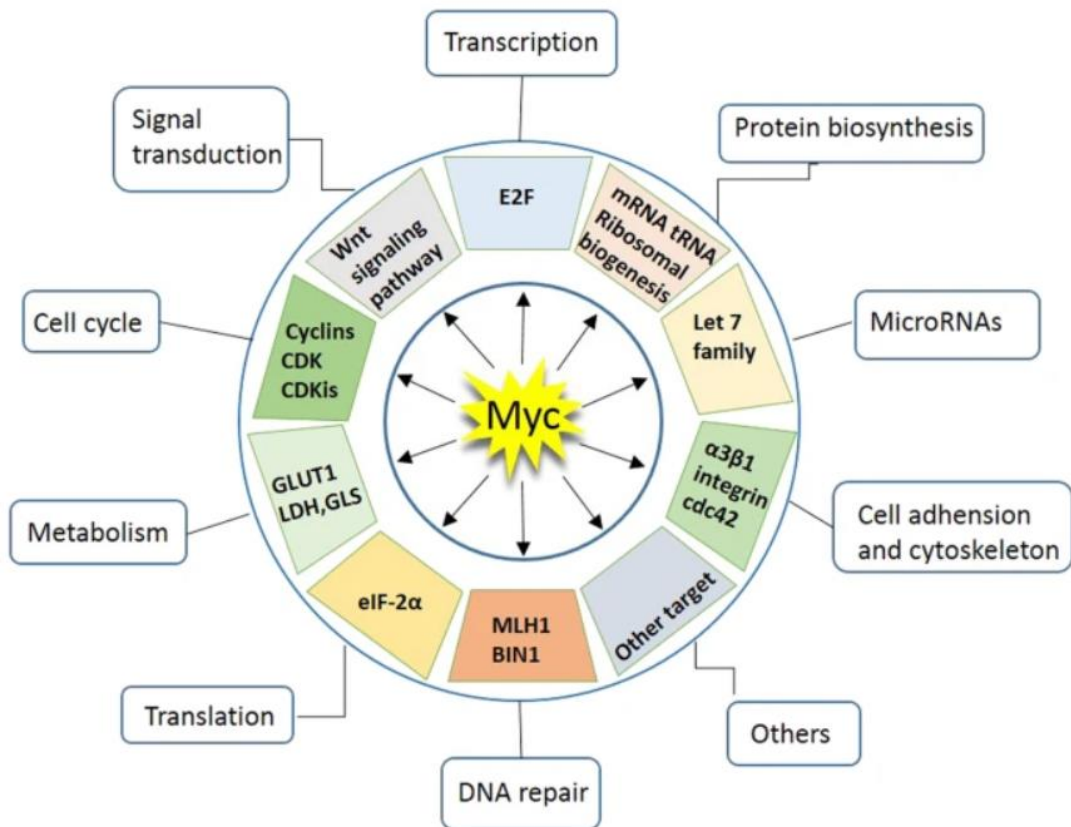
Όλη η πορεία που απαιτείται για την ανάπτυξη ενός όγκου, από την έναρξη μέχρι και την εξέλιξη, βασίζεται σε «υπέρ-ενεργοποίηση» διαφόρων εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών. Οι αναστολείς μικρού μοριακού βάρους ως αντικαρκινικά φάρμακα, έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τη στόχευση διαμεμβρανικών υποδοχέων ή ενδοκυττάρων πρωτεϊνών. Η έρευνα πάνω στην ανάπτυξη τέτοιων ενώσεων έχει οδηγήσει σε φάρμακα που στοχεύουν σε διάφορες κινάσες (σερίνης, θρεονίνης, τυροσίνης), μεταλλοπρωτεϊνάσες, πρωτεΐνες θερμικού σοκ και πολλών άλλων πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια [90].



Εικόνα 20. Αναστολείς μικρού μοριακού βάρους για στοχευμένη θεραπεία [90]

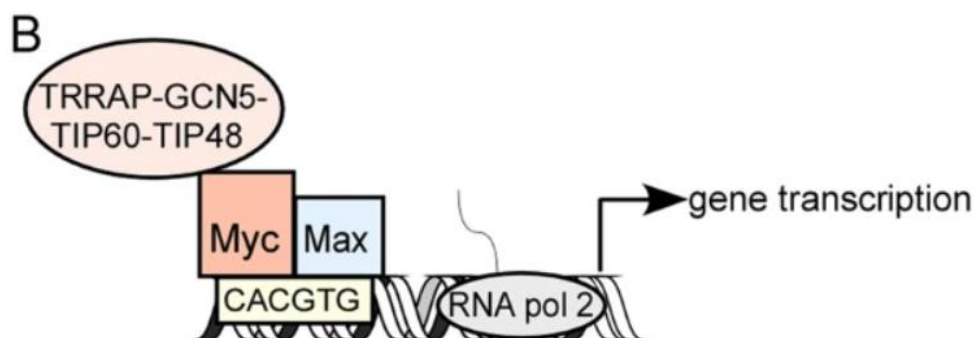
1.8 Σχέση πρωτεΐνης Μγς-καρκίνου

Η οικογένεια ογκογονιδίων *MYC* αποτελείται από τρία μέλη: το *C-MYC*, το *MYCN* και το *MYCL*, τα οποία κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες c-Myc, N-Myc και L-Myc αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες MYC ανήκουν σε μία ομάδα που ονομάζεται «υπέρ-μεταγραφικοί παράγοντες», που πιθανώς ρυθμίζει τη μεταγραφή του 15% του γονιδιώματος. Μερικές από τις λειτουργίες που ρυθμίζουν με τη δράση τους είναι η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση και η επιβίωση των κυττάρων, καθώς και αποκρίσεις του ανοσοποιητικού [91], [92].



Εικόνα 21. Λειτουργίες του κυττάρου που ελέγχει η πρωτεΐνη Myc [93]

Οι MYC πρωτεΐνες εμφανίζουν μεγάλη ομολογία όσον αφορά τη δομή τους, συμπεριλαμβανομένης και μίας περιοχής στο C-τελικό άκρο που ονομάζεται φερμουάρ λευκίνης (leucine-zipper). Για να λειτουργήσει μία Myc πρωτεΐνη ως μεταγραφικός παράγοντας, προσδένεται πρώτα στην πρωτεΐνη Max μέσω αυτής της περιοχής. Το ετεροδιμερές Myc/Max προσελκύει ένα σύμπλοκο τροποποίησης της χρωματίνης και ενεργοποιεί τη μεταγραφή με την πρόσδεσή του στη διατηρημένη αλληλουχία DNA “CACGTG” (**Εικόνα 22**) [94], [93].



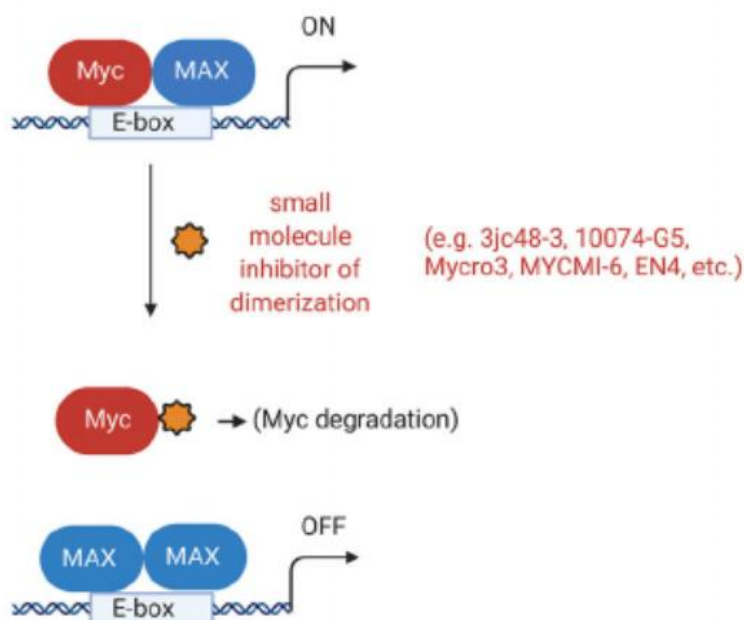
Εικόνα 22. Πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα Myc-Max στο DNA και εκκίνηση της μεταγραφής [93]

Η έκφραση των πρωτεϊνών Myc είναι αυστηρά ελεγχόμενη υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες αυτές απορρυθμίζονται στην περίπτωση του καρκίνου λόγω διαφόρων παραγόντων (π.χ.

μεταλλάξεις). Μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει ότι ακόμη και παροδική απενεργοποίηση της Myc πρωτεΐνης οδηγεί σε υποχώρηση του όγκου, γεγονός που μπορεί να αξιοποιηθεί για τη θεραπεία του καρκίνου. Η ανάπτυξη φαρμάκων, όμως, που να εξυπηρετούν αυτόν το σκοπό είναι απαιτητική. Πρώτα από όλα, η πρωτεΐνη Myc, ως μεταγραφικός παράγοντας, δεν διαθέτει ένα συγκεκριμένο ενεργό κέντρο για μικρά μόρια. Επίσης, η θέση της πρωτεΐνης είναι στον πυρήνα, γεγονός που συμβάλλει στη δυσκολία του εγχειρήματος [93].

1.9 Στοιχεύοντας στο σύμπλοκο Myc-Max

Το σύμπλοκο Myc-Max είναι απαραίτητο για την πρόσδεση στο DNA και τη μετέπειτα ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων. Η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών σχηματίζει μία αριστερόστροφη δέσμη τεσσάρων ελίκων, όπου κάθε μονομερές σχηματίζει με τις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων δύο έλικες. Ανάμεσα στις έλικες υπάρχουν περιοχές χωρίς συγκεκριμένη δομή. Παρά το γεγονός ότι διάφορες μελέτες δείχνουν πως αυτή η δομή δε διαθέτει θέση για να λειτουργήσει κάποιο μόριο-αναστολέας, πολλά εργαστήρια έχουν απεικονίσει μόρια να μπλοκάρουν την αλληλεπίδραση Myc-Max [95],[96].



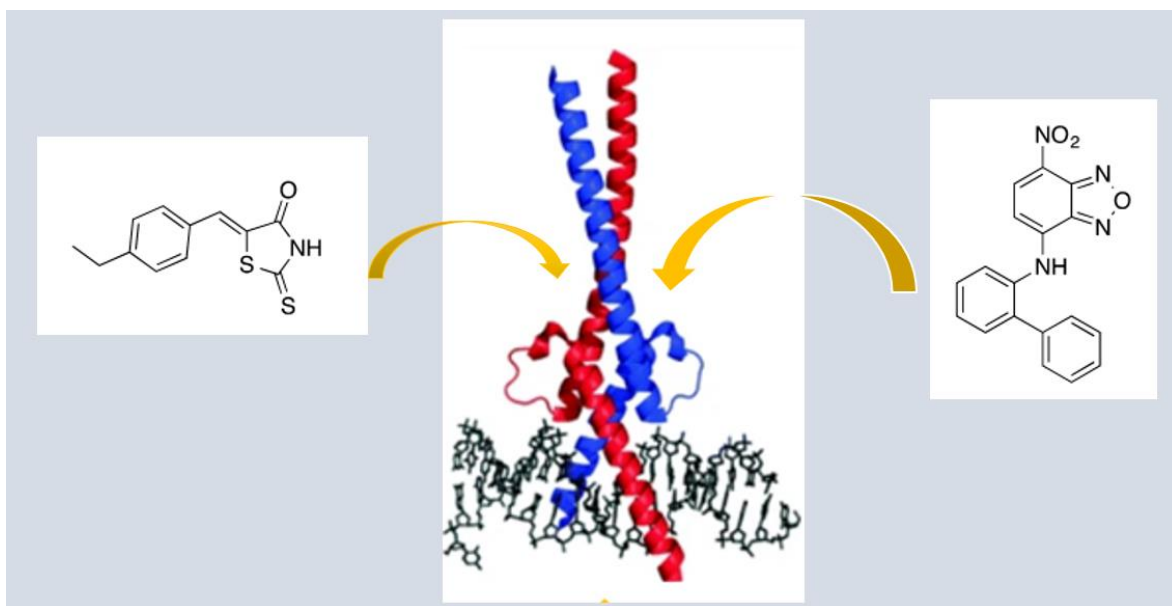
Εικόνα 23. Επίδραση του αναστολέα σχηματισμού του συμπλόκου Myc-Max. Η αδυναμία σχηματισμού του συμπλόκου οδηγεί σε αποικοδόμηση της πρωτεΐνης Myc [97]

1.10 Σκοπός

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, είναι επιτακτική ανάγκη η ανάπτυξη νέων μεθόδων διάγνωσης και αντιμετώπισης του καρκίνου. Οι συμβατικές αντικαρκινικές θεραπείες (χειρουργική επέμβαση, χημειοθεραπείες, ραδιοθεραπεία) χαρακτηρίζονται από χαμηλή εκλεκτικότητα, υψηλό κόστος και είναι αρκετά επίπονες για τον ασθενή. 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. Πλέον το ενδιαφέρον των ερευνητών στρέφεται στην ανάπτυξη ενώσεων μικρού μοριακού βάρους που δρουν ως αναστολείς συγκεκριμένων πρωτεϊνών οι οποίες ρυθμίζουν σημαντικές λειτουργίες για την ανάπτυξη και την επιβίωση του κυττάρου.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η αξιολόγηση θεραπευτικών μορίων τα οποία θα στοχεύουν τον δύσκολο στοχεύσιμο φαρμακευτικό στόχο της Mgc. Το ογκογονίδιο Mgc απορρυθμίζεται στο 70% των καρκίνων του ανθρώπου, όπως του πνεύμονα, του μαστού, του παχέος εντέρου κ.λπ. Λόγω του κεντρικού του ρόλου σε σχεδόν κάθε πτυχή της ογκογόνου διαδικασίας, του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης και της διαφοροποίησης, αποτελεί σημαντικό στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου. Το Mgc ανήκει σε εγγενώς διαταραγμένες πρωτεΐνες (IDP) και στερείται τόσο συνδετικής όσο και ενζυματικής δραστηριότητας, καθιστώντας το Mgc δύσκολο-στοχεύσιμο φαρμακευτικό. Τα θεραπευτικά μόρια σχεδιάστηκαν να αναστέλλουν τον σχηματισμό του διμερούς των πρωτεϊνών Mgc – Max και κατά την αλληλεπίδραση με την Mgc αναμένεται η αλλαγή των φωτοφυσικών ιδιοτήτων τους.

Ο σχεδιασμός των μορίων έγινε μελετώντας την διεθνή βιβλιογραφία η οποία αποτελείται από πλήθος μορίων τα οποία είναι εν δυνάμει αναστολείς της αλληλεπίδρασης μεταξύ Mgc και Max καθώς και κάνοντας χρήση υπολογιστικών μελετών.



Εικόνα 24. Γνωστοί αναστολείς του σχηματισμού του συμπλόκου Mgc-Max [98]

Παρατηρώντας τους γνωστούς αναστολείς της εικόνας **24**, εντοπίζουμε κάποια κοινά χαρακτηριστικά:

- Διαθέτουν ένα πολικό τμήμα που μπορεί να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου
- Διαθέτουν ένα υδρόφοβο τμήμα που μπορεί να συμμετάσχει σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις
- Έχουν επίπεδη δομή

Βασιζόμενοι, λοιπόν, σε αυτά τα στοιχεία σχεδιάσαμε και συνθέσαμε τις παρακάτω ενώσεις

Επίσης, τα μόρια σχεδιάστηκαν ώστε να ανταποκρίνονται και σε χαρακτηριστικά του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος, όπως για παράδειγμα το ιξώδες και οι μεταβολές του pH και για αυτό και θα αξιολογηθούν ως προς αυτήν την ικανότητα.

Κεφάλαιο 2: Πειραματικό μέρος

2.1 Υλικά και μέθοδοι

Όλα τα εμπορικά διαθέσιμα χημικά 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 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 ($\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4\text{H}$).

Για τη σύνθεση χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- 2,4-διυδροξυ ακετοφαινόνη, ιωδομεθάνιο, μαλονονιτριλίου, τριβρωμιούχο βόριο, 2-διυδροξυ ακετοφαινόνη, πιπεραζίνη από την Alfa Aesar
- 4-φθοροβενζαλδεΰδης, N, N'-διισοπροπυλκαρβοδιιμίδιο από τη Fluorochem
- Νάτριο από τη Sigma-Aldrich
- 3,4,5-τριυδροξυ-βενζαλδεΰδης, 3-νιτρο-4-υδροξυ-βενζαλδεΰδης από τη Carbosynth
- 2-φουρανπροπανοϊκό οξύ από την Acros Organics
- Υδροξυβενζοτρίαζόλιο από τη GL Biochem

Και διαλύτες:

- Διχλωρομεθάνιο, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη, οξικός ανυδρίτης, διοξάνιο υδροχλωρικό οξύ, οξικό οξύ, θειικό οξύ από τη Sigma-Aldrich
- Εξάνιο από τη Macron Fine Chemicals
- Αιθανόλη, νερό και διμεθυλοφωσφορικό οξύ από την Fisher Chemicals
- Ακετονιτρίλιο από την J.T. Bakers
- Δευτεριωμένοι διαλύτες: DMSO- d_6 και CDCl_3 αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma Aldrich

Φασματοσκοπία NMR

Τα φάσματα ^1H NMR και 2D ^1H - ^{13}C HSQC -HMBC καταγράφηκαν σε φασματόμετρο Bruker Avance FT-NMR 250 MHz, 400 MHz ή 500 MHz. Το πρόγραμμα Topspin 2.1 χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του συστήματος NMR.

Φασματοσκοπία UV-Vis

Τα φάσματα UV-Vis καταγράφηκαν με φασματοφωτόμετρο Edinburg D5S σε κυψελίδα χαλαζία 1 cm σε κατάλληλες σταθερές θερμοκρασίες (π.χ., μετρήσεις σε διάφορες θερμοκρασίες για την επίδραση του ιξώδους). Τυπικά πειράματα τιτλοδότησης πραγματοποιήθηκαν με διαδοχικές προσθήκες του αναλύτη στο ίδιο διάλυμα δείγματος 3 mL (10,0 μM) σε κυψελίδα χαλαζία.

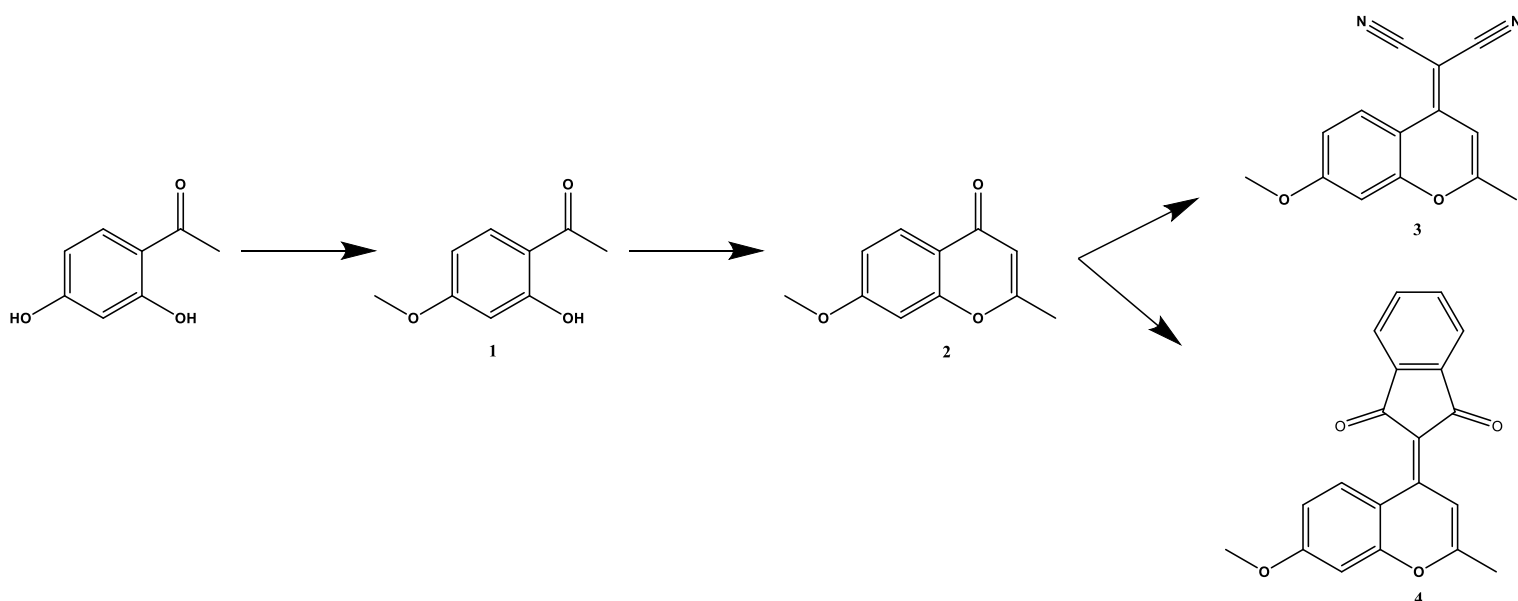
Φασματοσκοπία φθορισμού

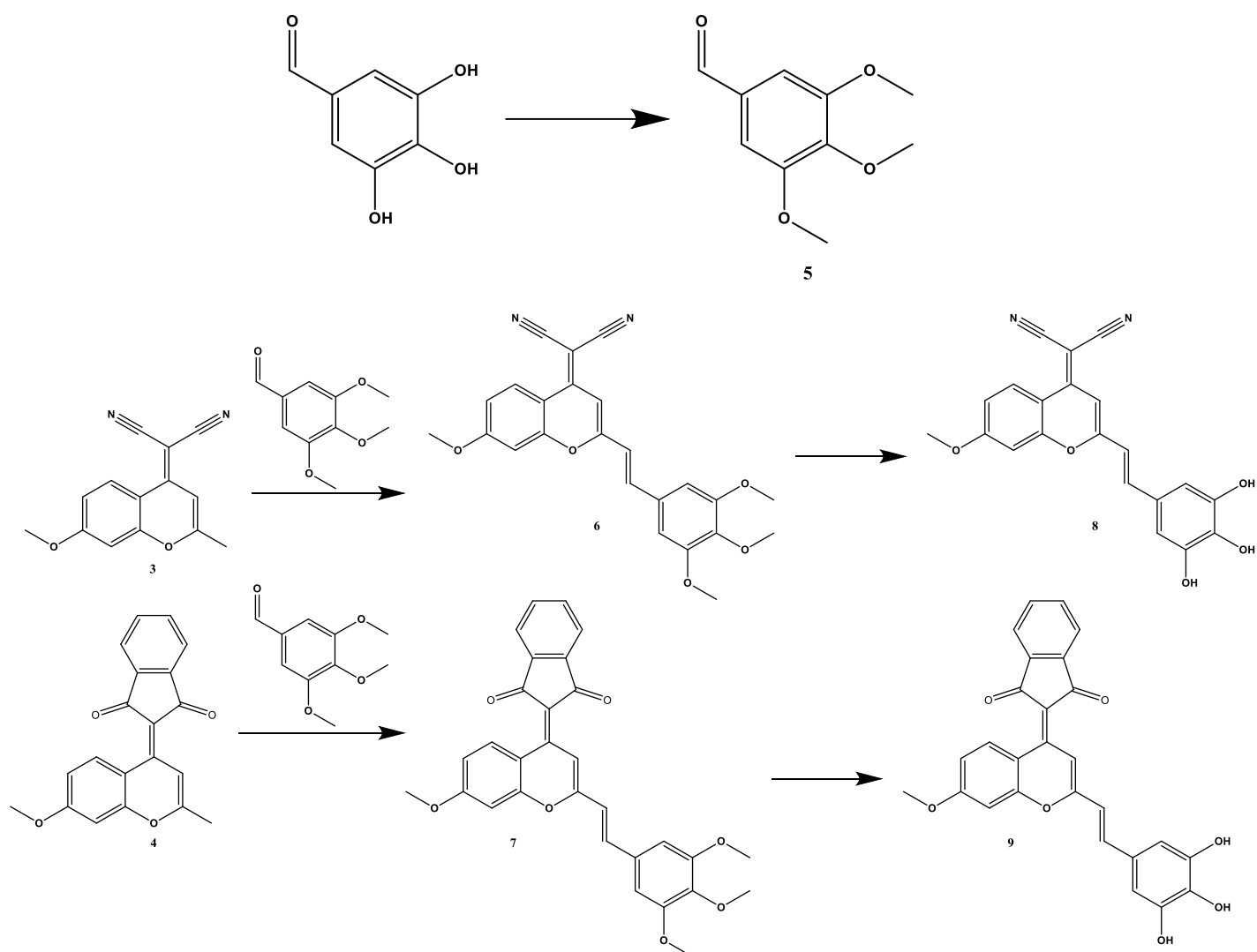
Τα φάσματα φθορισμού καταγράφηκαν με Edinburg F5S σε κυψελίδα χαλαζία 1 cm σε κατάλληλες σταθερές θερμοκρασίες. Τυπικά πειράματα τιτλοδότησης πραγματοποιήθηκαν με διαδοχικές προσθήκες αναλύτη στο ίδιο διάλυμα δείγματος 3 mL (10,0 μM) σε κυψελίδα χαλαζία.

Ημιπαρασκευαστικοί και παρασκευαστικοί καθαρισμοί με RP-HPLC

Οι ημι-παρασκευαστικοί και παρασκευαστικοί καθαρισμοί RP-HPLC πραγματοποιήθηκαν σε χρωματογράφο ThermoScientific Ultimate 3000 εξοπλισμένο με αντλία Dionex Ultimate 3000 και ανιχνευτή μήκους κύματος. Οι ημι-παρασκευαστικοί καθαρισμοί πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας μια στήλη Jupiter 4 μm Proteo 90Å C18 (250 $\times$ 10 mm) με ροή 5 mL min⁻¹, ενώ οι αντίστοιχοι παρασκευαστικοί καθαρισμοί πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας μια στήλη Phenomenex Jupiter 10 μm Proteo 90Å C18 (250 $\times$ 21.2 mm) με ροή 20 mL min⁻¹. Ο ανιχνευτής μήκους κύματος ήταν ρυθμισμένος στα 254 nm σε όλους τους καθαρισμούς, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά.

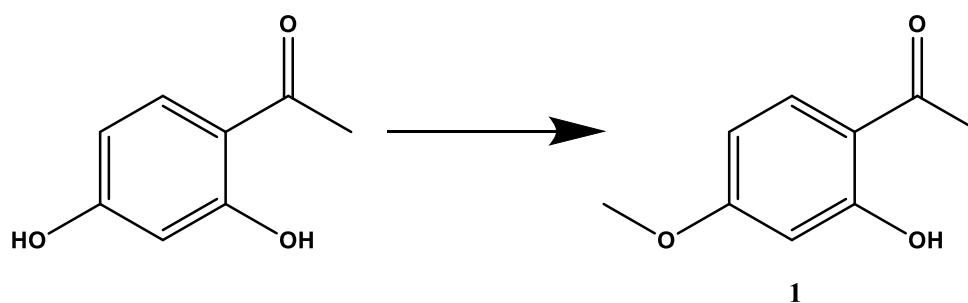
2.2 Σύνθεση και αξιολόγηση πιθανών αναστολέων του σχηματισμού του συμπλόκου Mgc-Max (ενώσεις 8 και 9)





Εικόνα 25. Απεικόνιση της συνθετικής πορείας για τη σύνθεση των ενώσεων 8 και 9

2.2.1 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 1



Εικόνα 26. Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 1

Πειραματική πορεία

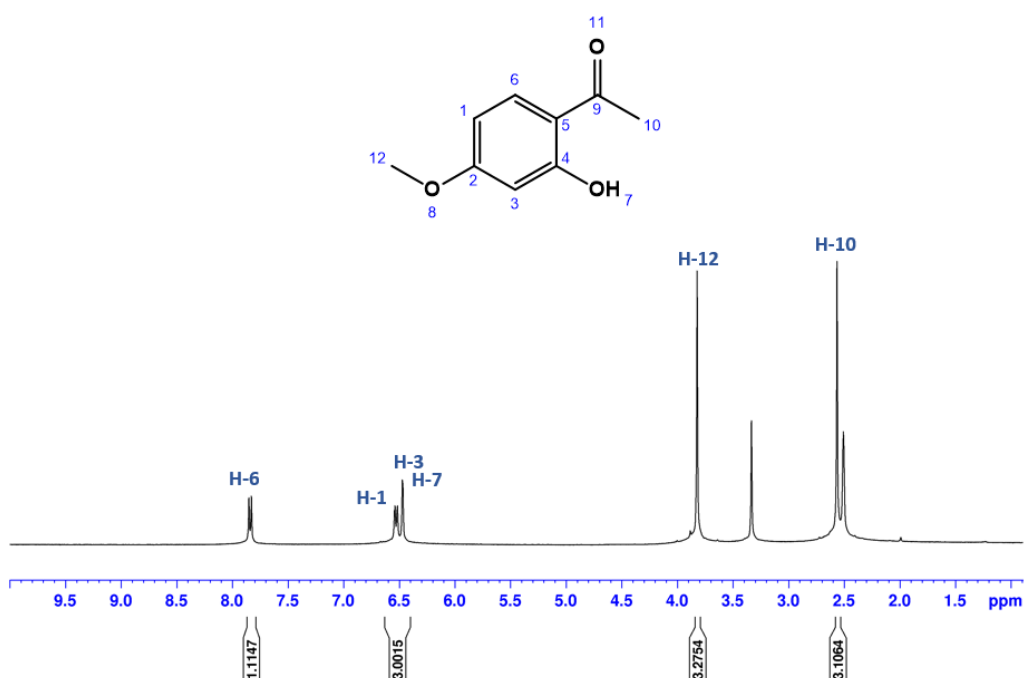
Για τη σύνθεση της ένωσης 1 πραγματοποιήθηκε αντίδραση μεθυλίωσης. Πρόκειται για μία πυρηνόφιλη προσβολή τύπου S_N2 της υδροξυλομάδας στο ιωδομεθάνιο.

Η 2,4 διυδροξυ ακετοφαινόνη (2 g, 13.2 mmol) μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη των 500 ml και ακολούθησε η προσθήκη ιωδομεθανίου (2.44 ml, 39.4 mmol) με σταγονομετρικό χωνί υπό N_2 (g). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 16 ώρες.

Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών 30% ν/ν οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο.

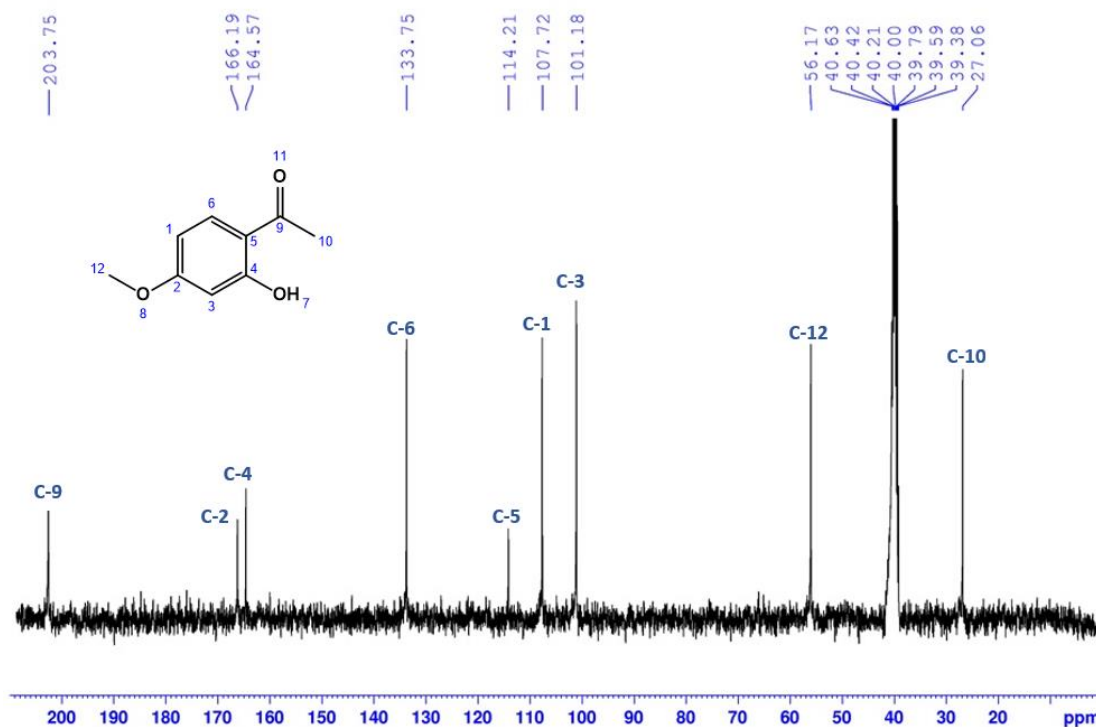
Έπειτα έγινε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα/νερό (το προϊόν περνάει στην οργανική φάση και η περίσσεια ιωδομεθανίου μετατρέπεται σε μεθανόλη). Οι οργανικές φάσεις ξηράθηκαν με άνυδρο Na_2SO_4 , και συμπυκνώθηκαν με εξάτμιση υπό υψηλό κενό.

Μετά ακολούθησε χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών οξικό αιθυλεστέρα/εξάνιο. Έγινε σταδιακή άνοδος της πολικότητας μέχρι το 2.5%. Απομονώθηκαν 1,9g καθαρού προϊόντος με τη μορφή κίτρινου ελαίου (απόδοση 89%).



Εικόνα 27. Φάσμα 1H -NMR της ένωσης 1 σε DMSO- d_6 (400 MHz, 25 °C)

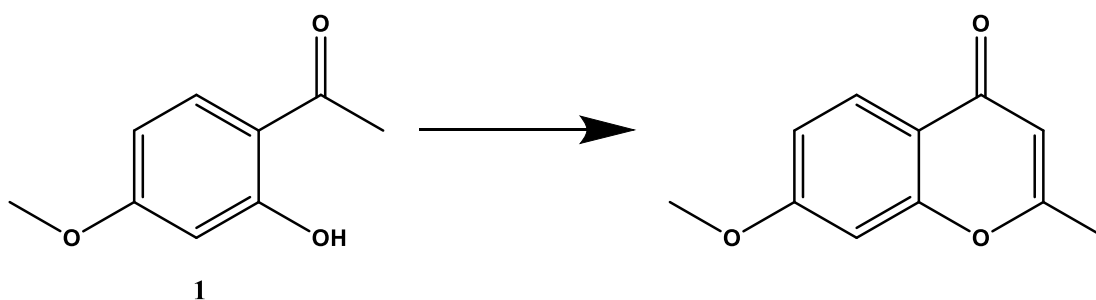
1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.84 (d, $J=9.44$ Hz, 1H, H-6), 6.53 (d, $J = 9.44$ Hz, 1H, H-1), 6.47 (s, 2H, H-3, H-7), 3.82 (s, 3H, H-12), 2.61 (s, 3H, H-10)



Εικόνα 28. Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης 1 σε DMSO-d_6 (400 MHz, 25 °C)

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ : 203.75 (C-9), 166.19 (C-2), 164.57 (C-4), 133.75 (C-6), 114.21 (C-5), 107.72 (C-1), 101.18 (C-3), 56.17 (C-12), 27.06 (C-10)

2.2.2 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 2



Εικόνα 29. Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 2

Πειραματική πορεία

Για τη σύνθεση της ένωσης 2, αρχικά με μια αντίδραση Claisen με τη χρήση μεταλλικού νατρίου και άνυδρου οξικού αιθυλεστέρα προέκυψε ενδιάμεσο προϊόν δικετόνης (δεν απομονώθηκε). Στη συνέχεια έγινε αντίδραση με μεθανόλη και πυκνό υδροχλωρικό οξύ (καταλυτική ποσότητα) και με ενδομοριακή αντίδραση αλδολικής συμπίκνωσης, προέκυψε η ένωση 2.

Αναλυτικά:

Η ένωση 1 (1.9 g, 11.4 mmol) διαλύθηκε σε οξικό αιθυλεστέρα. Ακολούθησε προσθήκη νατρίου (1 g, 44 mmol) (έχει το ρόλο της βάσης). Η αντίδραση αφέθηκε χωρίς την επίδραση θέρμανσης, υπό ανάδευση για 15 ώρες.

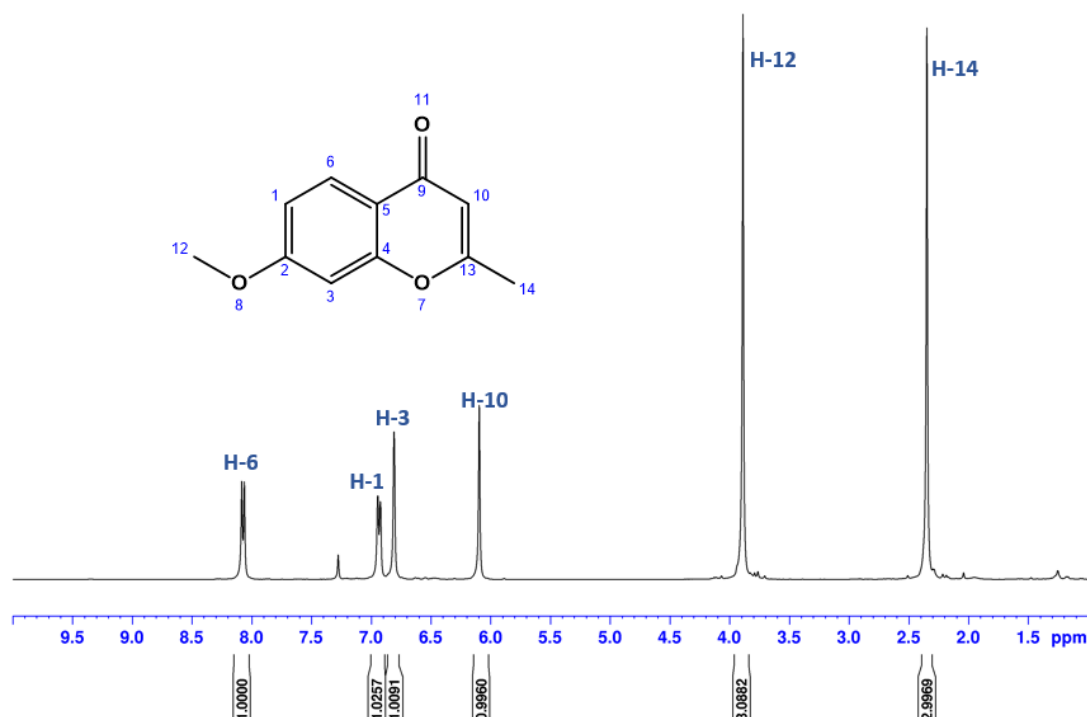
Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών 30% ν/ν οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο.

Ακολούθησε εξουδετέρωση του νατρίου και συμπύκνωση με εξάτμιση υπό υψηλό κενό. Έπειτα πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα/νερό (το προϊόν περνάει στην οργανική φάση). Οι οργανικές φάσεις ξηράθηκαν με άνυδρο Na_2SO_4 , και συμπυκνώθηκαν με εξάτμιση υπό υψηλό κενό.

Το στερεό που λήφθηκε δε χρειάστηκε περαιτέρω καθαρισμό, οπότε χρησιμοποιήθηκε για την επόμενη αντίδραση: διαλύθηκε σε 25 ml μεθανόλης και ακολούθησε προσθήκη 3 ml πυκνού υδροχλωρικού οξέος. Η αντίδραση αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση για 15 ώρες.

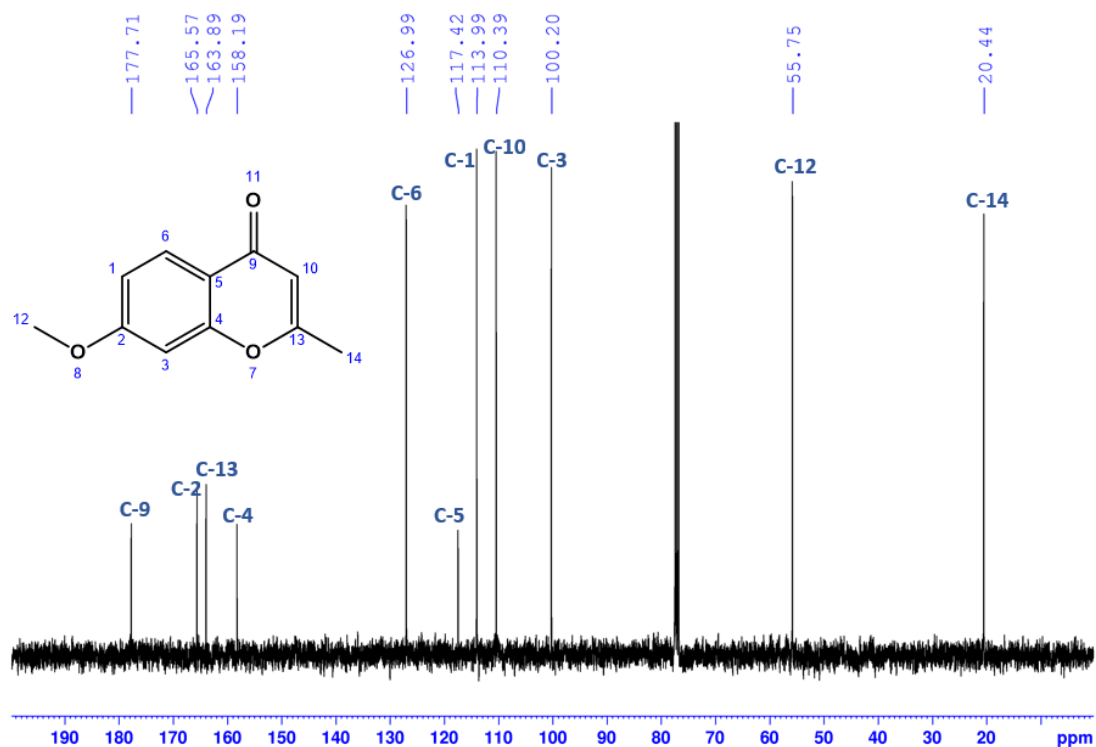
Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών 50% ν/ν οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο.

Ο καθαρισμός έγινε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα διαλυτών οξικό αιθυλεστέρα/εξάνιο. Έγινε σταδιακή άνοδος της πολικότητας μέχρι το 40%, όπου και συλλέχθηκε το προϊόν. Ακολούθησε συμπύκνωση με εξάτμιση υπό υψηλό κενό. Λήφθηκαν 1.3 g προϊόντος με τη μορφή λευκού στερεού (απόδοση 50%).



Εικόνα 30. Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 2 σε CDCl_3 (400 MHz, 25 °C)

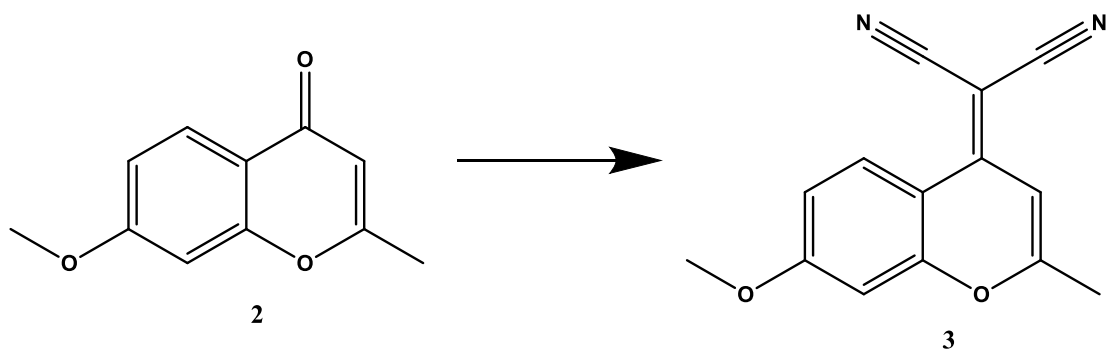
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.07 (d, $J=8.44$ Hz, 1H, H-6), 6.93 (d, $J=8.44$ Hz, 1H, H-1), 6.81 (s, 1H, H-3), 6.09 (s, 1H, H-10), 3.89 (s, 3H, H-12), 2.38 (s, 3H, H-14)



Εικόνα 31. Φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης 2 σε CDCl_3 (400 MHz, 25 °C)

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 177.71 (C-9), 165.57 (C-2), 163.89 (C-13), 158.19 (C-4), 126.99 (C-6), 117.42 (C-5), 113.99 (C-1), 110.39 (C-10), 100.20 (C-3), 55.75 (C-12), 20.44 (C-14)

2.2.3 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 3



Εικόνα 32. Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 3

Πειραματική πορεία

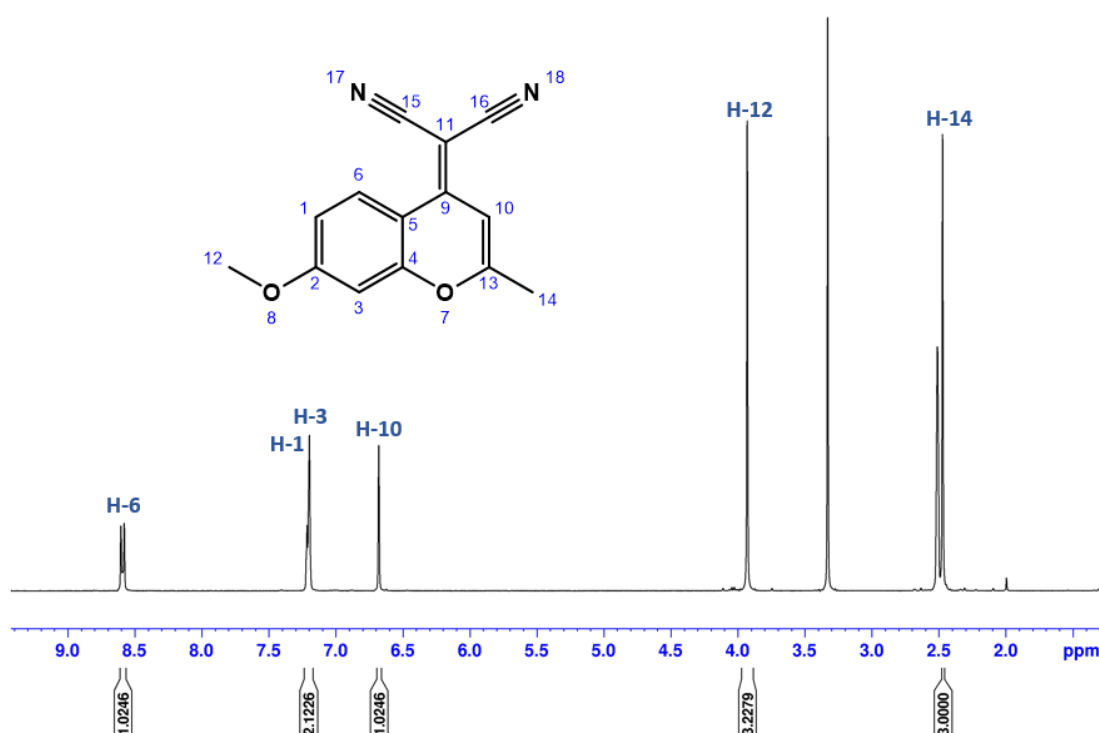
Για τη σύνθεση της ένωσης 3 έγινε αντίδραση συμπύκνωσης Knoevenagel και αντί κετόνης έχει ενσωματωθεί το δικυανομεθυλένιο.

Η ένωση 2 (1.3 g, 6,5 mmol) μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη των 25ml και διαλύθηκε σε 5 ml οξικού ανυδρίτη. Ακολούθησε η προσθήκη του μαλονονιτριλίου (4 ml, 68.4 mmol) και η αντίδραση αφέθηκε υπό reflux και ανάδευση για 15 ώρες.

Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών 50% ν/ν οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο.

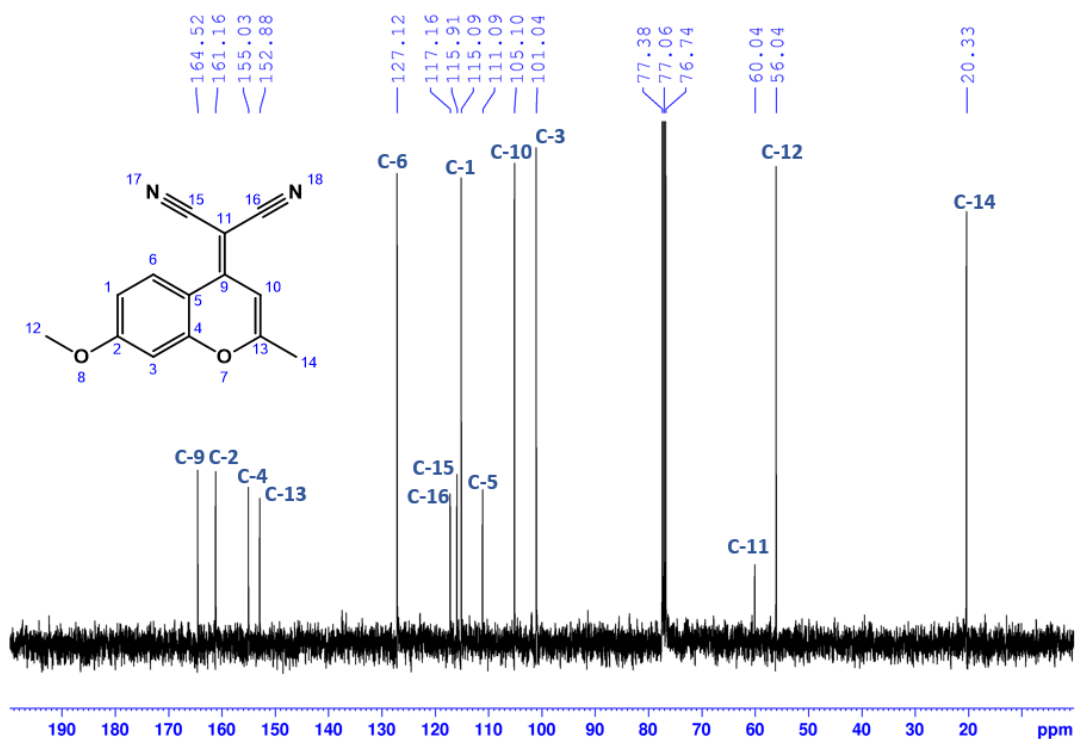
Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνθηκε με απόσταση υπό υψηλό κενό. Έπειτα πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα/νερό (το προϊόν περνάει στην οργανική φάση). Οι οργανικές φάσεις ξηράθηκαν με άνυδρο Na_2SO_4 , και συμπυκνώθηκαν με εξάτμιση υπό υψηλό κενό.

Ακολούθησε καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως σύστημα διαλυτών οξικό αιθυλεστέρα/εξάνιο. Έγινε σταδιακή αύξηση της πολικότητας στα ποσοστά 10, 20, 30, 40 και 50%, όπου και κατέβηκε το προϊόν. Λήφθηκαν 800mg προϊόντος με τη μορφή κίτρινου στερεού (απόδοση 40%).



Εικόνα 33. Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 3 σε DMSO-d_6 (400 MHz, 25 °C)

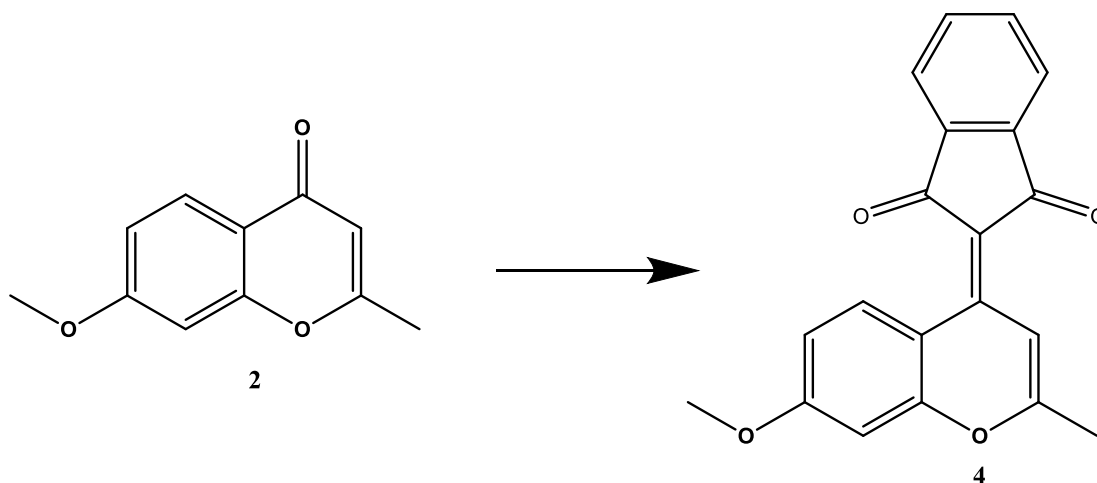
^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 8.51 (d, $J=9.92$ Hz, 1H, H-6), 7.18-7.22 (d, $J = 9.92$ Hz, 1H, H-1), 7.18-7.22 (s, 1H, H-3), 6.68 (s, 1H, H-10), 3.92 (s, 3H, H-12), 2.47 (s, 3H, H-14)



Εικόνα 34. Φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης 3 σε CDCl_3 (400 MHz, 25 °C)

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 164.52 (C-9), 161.16 (C-2), 155.03 (C-4), 152.88 (C-13), 127.12 (C-6), 117.16 (C-16), 115.91 (C-15), 115.09 (C-1), 111.09 (C-5), 105.10 (C-10), 101.04 (C-3), 60.04 (C-11), 56.04 (C-12), 20.33 (C-14)

2.2.4 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 4



Εικόνα 35. Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 4

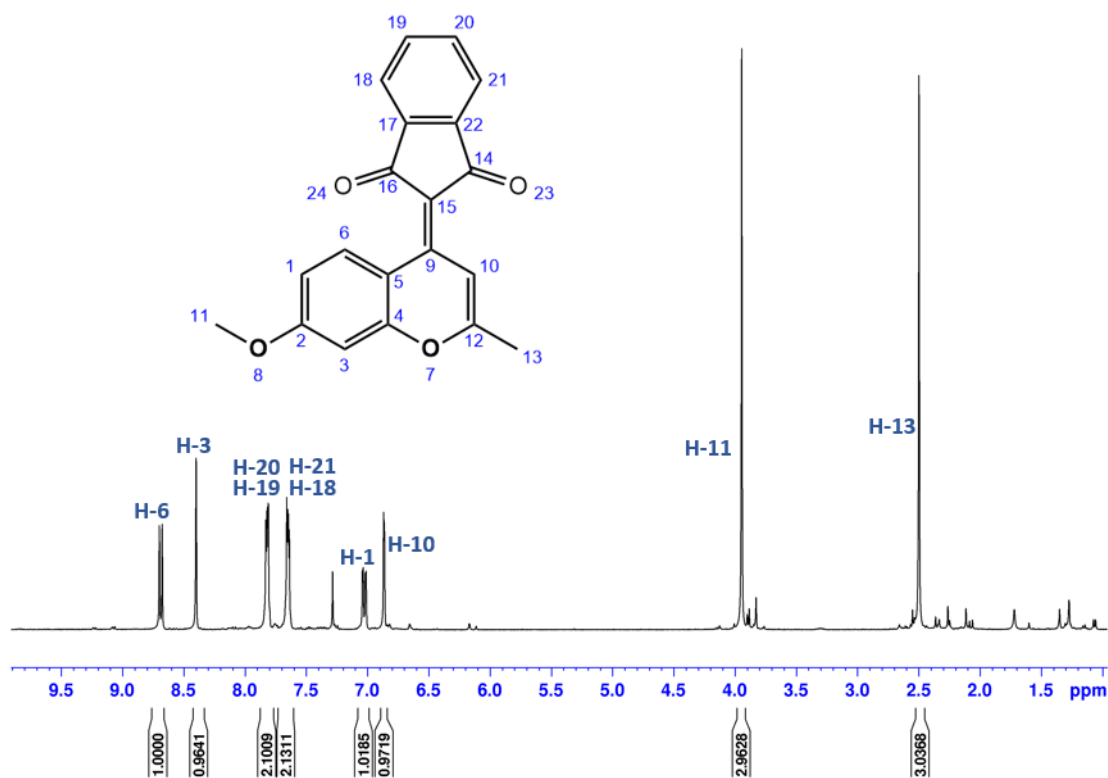
Για τη σύνθεση της ένωσης 4 έγινε αντίδραση συμπύκνωσης Knoevenagel και αντί κετόνης έχει ενσωματωθεί το 2,3-indanedione.

Η ένωση 2 (1.2 g, 6,0 mmol) μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη των 25ml και διαλύθηκε σε 5 ml οξικού ανυδρίτη. Ακολούθησε η προσθήκη του 2,3-indanedione (1.22g, 8.2 mmol) και η αντίδραση αφέθηκε υπό reflux και ανάδευση για 15 ώρες.

Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών 30% ν/ν οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο.

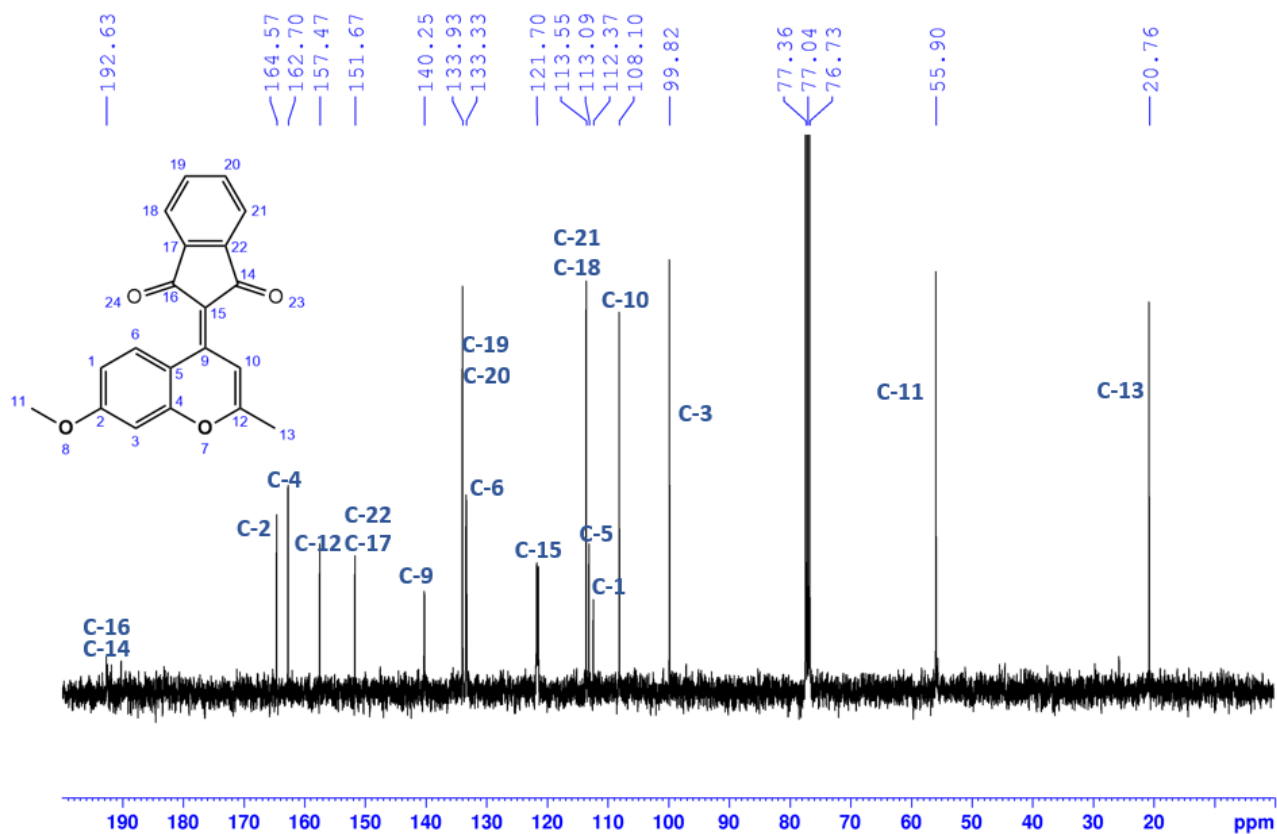
Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνθηκε με απόσταση υπό υψηλό κενό. Έπειτα πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα/νερό (το προϊόν περνάει στην οργανική φάση). Οι οργανικές φάσεις ξηράθηκαν με άνυδρο Na_2SO_4 , και συμπυκνώθηκαν με εξάτμιση υπό υψηλό κενό.

Ακολούθησε καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως σύστημα διαλυτών οξικό αιθυλεστέρα/εξάνιο. Έγινε σταδιακή αύξηση της πολικότητας στα ποσοστά 10, 15 και 20%, όπου και κατέβηκε το προϊόν. Λήφθηκαν 560mg προϊόντος με τη μορφή πορτοκαλί στερεού (απόδοση 47%).



Εικόνα 36. Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 4 σε CDCl_3 (400 MHz, 25 °C)

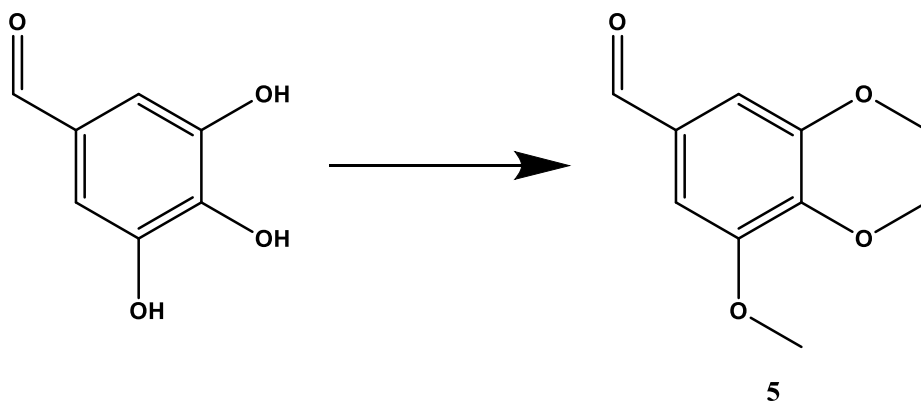
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.71 (d, $J=9.32$ Hz, 1H, H-6), 8.40 (s, 1H, H-3), 7.84 (d, $J=8.42$ Hz, 2H, H-19, H-20), 7.69 (d, $J=8.42$ Hz, 2H, H-18, H-21), 7.05 (d, $J=9.32$ Hz, 1H, H-1), 6.90 (s, 1H, H-10), 3.98 (s, 3H, H-11), 2.51 (s, 3H, H-13)



Εικόνα 37. Φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης 4 σε $\text{DMSO}-d_6$ (400 MHz, 25 °C)

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 192.63 (C-14, C-16), 164.57 (C-2), 162.70 (C-4), 157.47 (C-12), 151.67 (C-17, C-22), 140.25 (C-9), 133.93 (C-19, C-20), 133.33 (C-6), 121.70 (C-15), 113.55 (C-18, C-21), 113.09 (C-5), 112.37 (C-1), 108.10 (C-10), 99.82 (C-3), 55.90 (C-11), 20.76 (C-13)

2.2.5 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 5



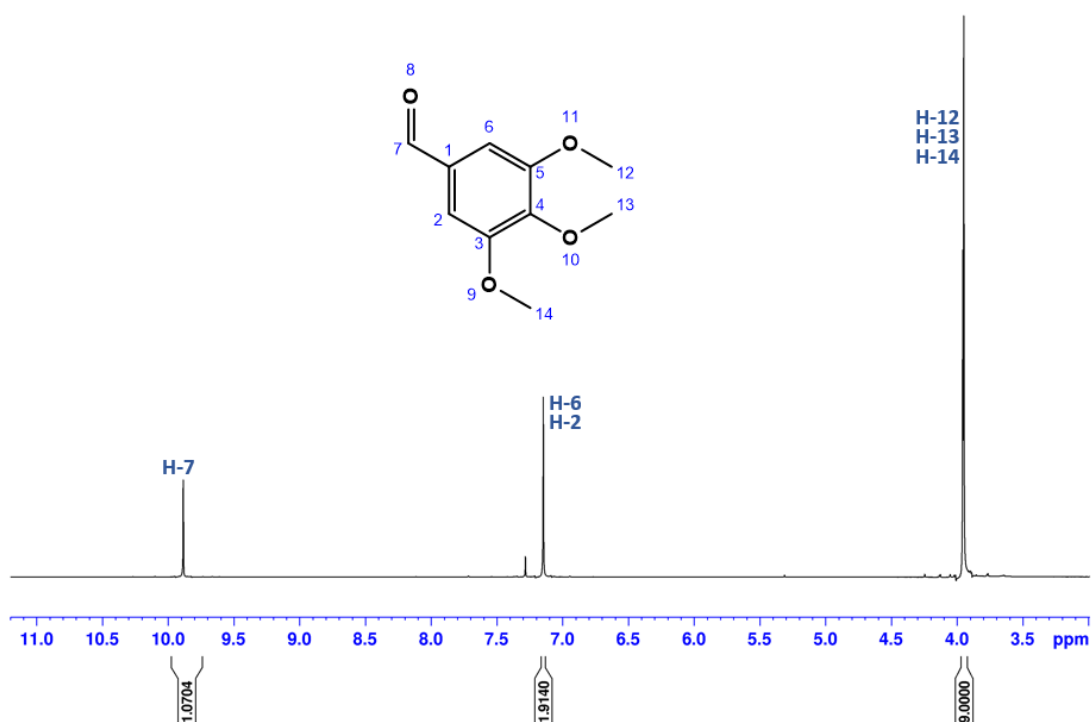
Εικόνα 38. Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 5

Πειραματική πορεία

Για τη σύνθεση της ένωσης 5 πραγματοποιήθηκε αντίδραση μεθυλίωσης. Πρόκειται για μία πυρηνόφιλη προσβολή τύπου S_N2 των υδροξυλομάδων στο ιωδομεθάνιο.

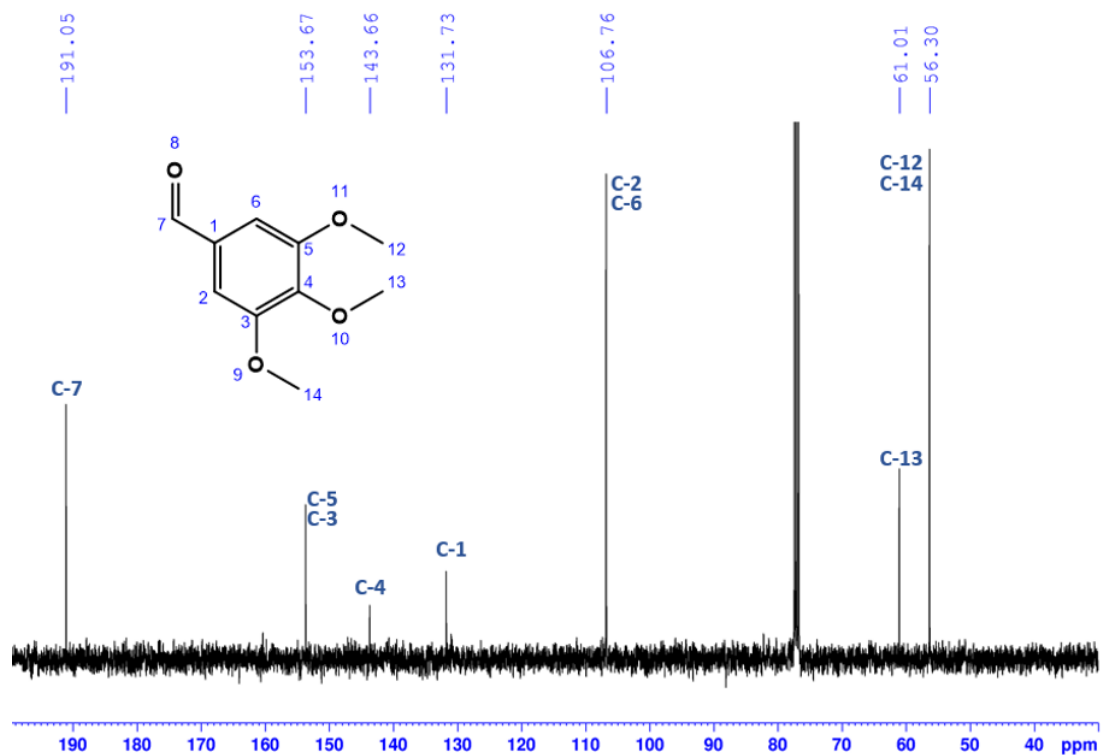
Σε διάλυμα της 3,4,5-τριυδροξυ-βενζαλδεΰδης (500 mg, 3.24 mmol) έγινε προσθήκη ιωδομεθανίου (1.6 ml, 25.95 mmol), K_2CO_3 (2.2 g, 16.22 mmol) σε άνυδρο ακετονιτρίλιο και το μείγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε για 15 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών 70% ν/ν οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο και στη συνέχεια στο μείγμα της αντίδρασης προστέθηκε νερό (100 mL) και ακολούθησε εκχύλιση με χρήση οξικού αιθυλεστέρα όπου συλλέχθηκαν οι οργανικές φάσεις. Οι οργανικές φάσεις ξηράθηκαν με άνυδρο Na_2SO_4 , συμπυκνώθηκαν με εξάτμιση υπό υψηλό κενό και το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε σαν καφέ στερεό με απόδοση 42% (598 mg).



Εικόνα 39. Φάσμα 1H -NMR της ένωσης 5 σε $CDCl_3$ (400 MHz, 25 °C)

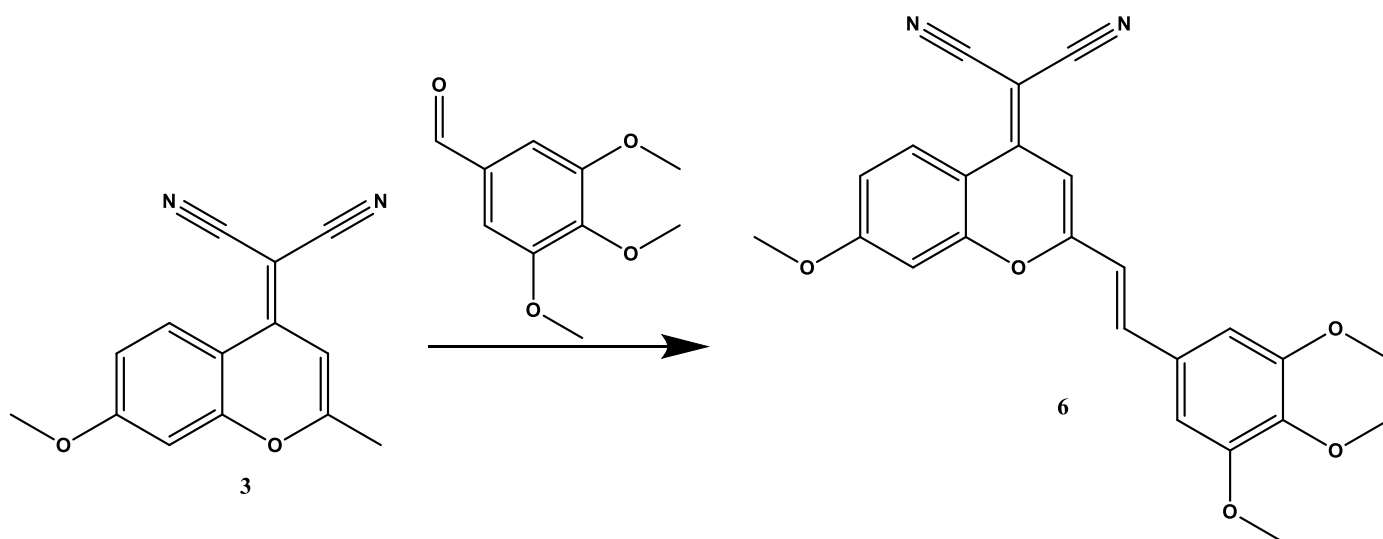
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.89 (s, 1H, H-7), 7.16 (s, 2H, H-2, H-6), 3.90-3.97 (s, 6H, H-12, H-14), 3.90-3.97 (s, 3H, H-13)



Εικόνα 40. Φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης 5 σε $\text{DMSO}-d_6$ (400 MHz, 25 °C)

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 191.05 (C-7), 154.67 (C-3, C-5), 143.66 (C-4), 132.73 (C-1), 107.76 (C-2, C-6), 62.01 (C-13), 56.30 (C-12, C-14)

2.2.6 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 6



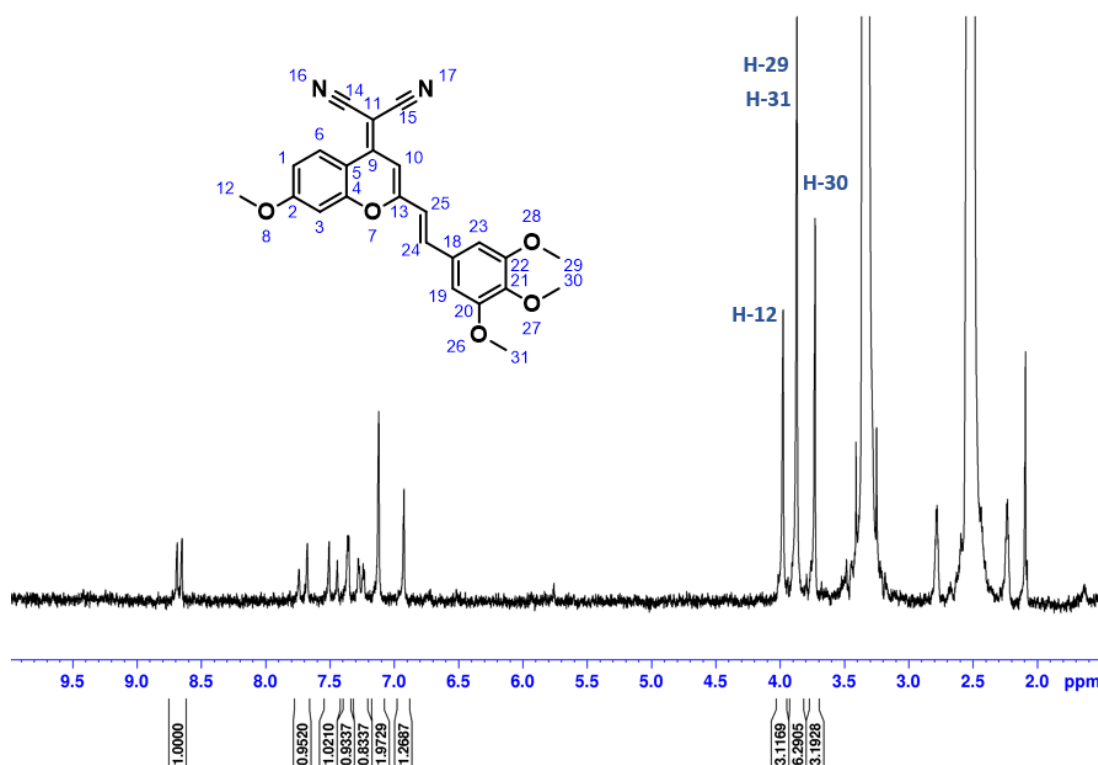
Εικόνα 41. Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 6

Πειραματική πορεία

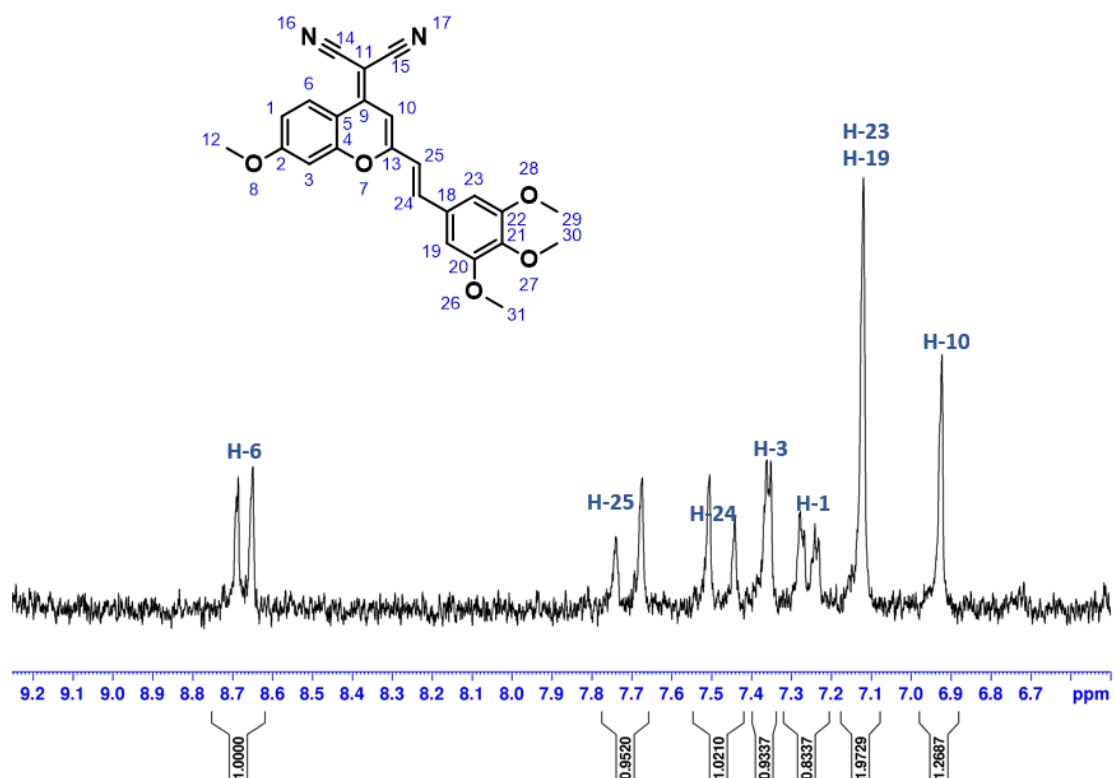
Η αντίδραση για τον σχηματισμό της ένωσης 8 προχωρά μέσω μιας αντίδρασης συμπύκνωσης τύπου Knoevenagel μεταξύ της ένωσης 4 και της ένωσης 5.

Η ένωση 4 (18 mg, 0.076 mmol) μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη των 10 ml και διαλύθηκε σε 3 ml ακετονιτριλίου. Ακολούθησε προσθήκη της ένωσης 5 (15 mg, 0.076 mmol) και σταγόνων πιπεριδίνης. Μετά την προσθήκη της πιπεριδίνης παρατηρήθηκε αλλαγή του χρώματος από κίτρινο σε καφέ-κόκκινο. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση και θέρμανση σε επαναροή για 15 ώρες.

Μετά από 15 ώρες είχε σχηματιστεί στερεό, το οποίο ελέγχθηκε με TLC. Το στερεό απομονώθηκε με φυγοκέντριση (22 mg, 69%).



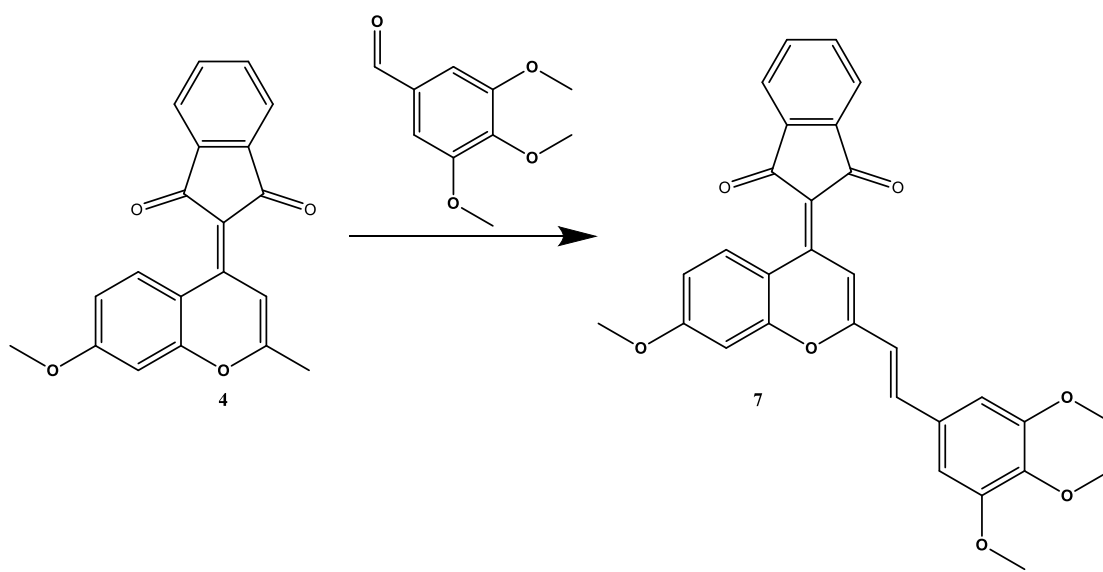
Εικόνα 42. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 6 σε DMSO-d_6 (400 MHz, 25 °C)



Εικόνα 43. Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 6 σε $\text{DMSO}-d_6$ (400 MHz, 25 °C)

^1H NMR (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.69 (d, $J=9.22$ Hz, 1H, H-6), 7.71 (d, $J=16.44$ Hz, 1H, H-25), 7.48 (d, $J=16.44$ Hz, 1H, H-24), 7.36 (s, 1H, H-3), 7.27 (d, $J=9.22$ Hz, 1H, H-1), 7.13 (s, 2H, H-19, H-23), 6.92 (s, 1H, H-10), 4.00 (s, 3H, H-12), 3.86 (s, 6H, H-29, H-31), 3.72 (s, 3H, H-30)

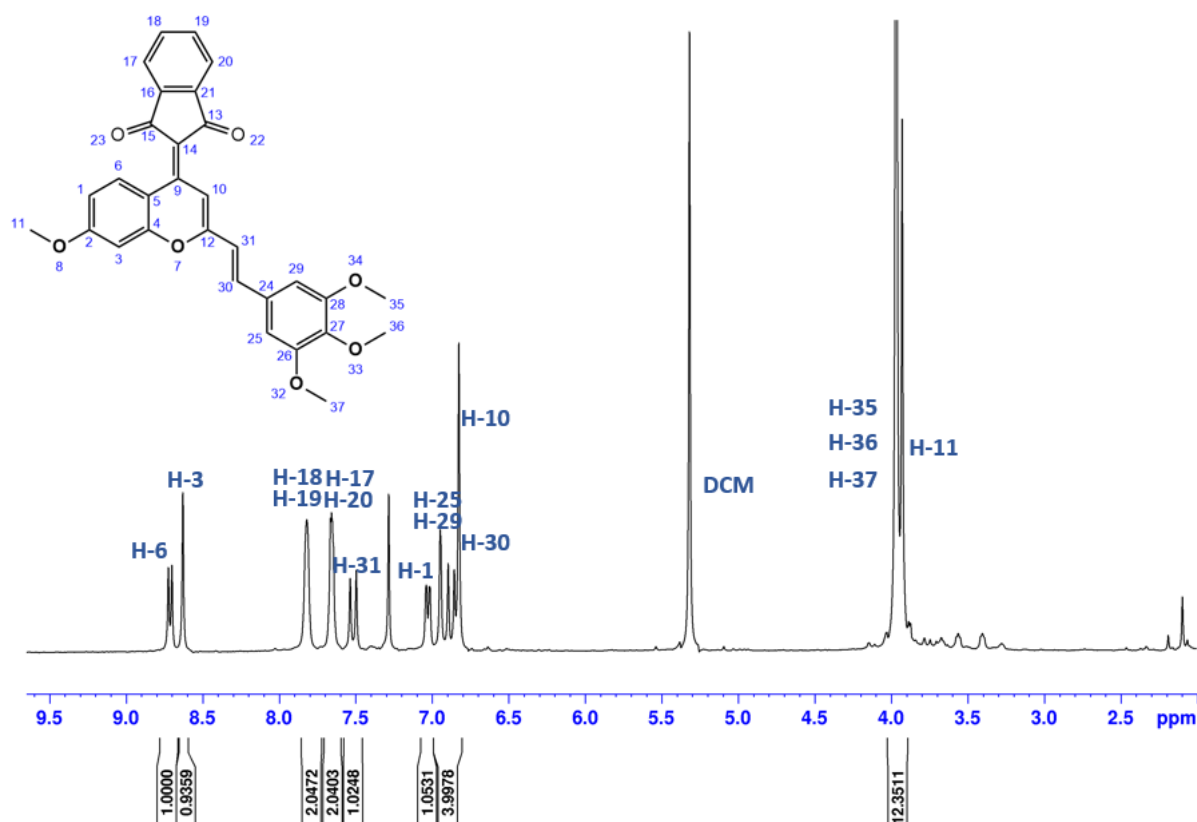
2.2.7 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 7



Η αντίδραση για τον σχηματισμό της ένωσης 7 προχωρά μέσω μιας αντίδρασης συμπύκνωσης τύπου Knoevenagel μεταξύ της ένωσης 4 και της ένωσης 5.

Η ένωση 4 (81 mg, 0.26 mmol) μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη των 10 ml και διαλύθηκε σε 3 ml ακετονιτριλίου. Ακολούθησε προσθήκη της ένωσης 5 (50 mg, 0.26 mmol) και σταγόνων πιπεριδίνης. Μετά την προσθήκη της πιπεριδίνης παρατηρήθηκε αλλαγή του χρώματος από κίτρινο σε καφέ-κόκκινο. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση και θέρμανση σε επαναροή για 15 ώρες.

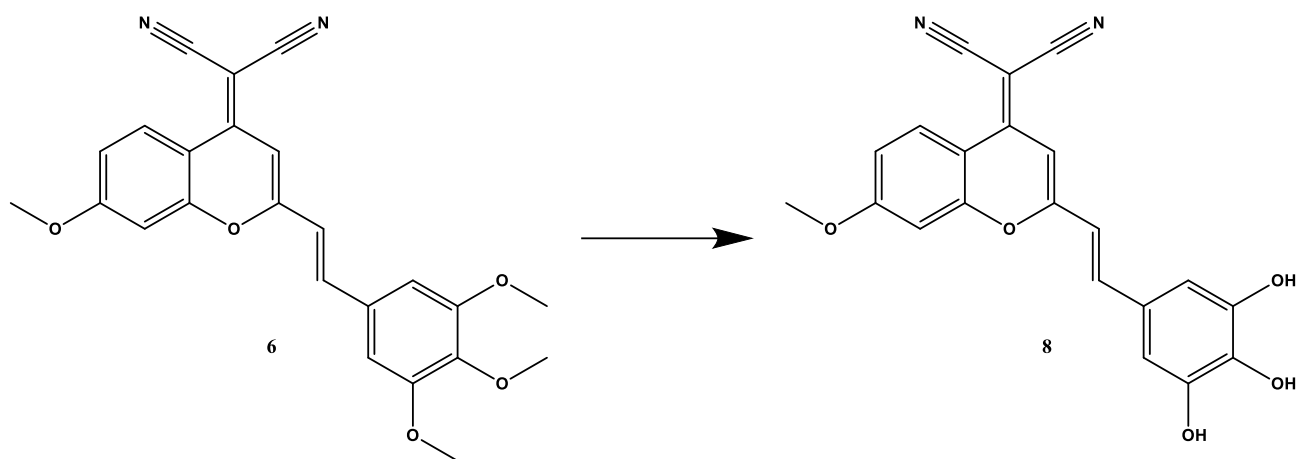
Μετά από 15 ώρες είχε σχηματιστεί στερεό, το οποίο ελέγχθηκε με TLC. Το στερεό απομονώθηκε με φυγοκέντριση (70 mg, 51%).



Εικόνα 44. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 7 σε DMSO-d_6 (400 MHz, 25 °C)

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6) δ : 8.73 (d, $J=9.22$ Hz, 1H, H-6), 8.17 (s, 1H, H-3), 7.80 (d, $J=8.42$ Hz, 2H, H-18, H-19), 7.71 (d, $J=8.42$ Hz, 2H, H-17, H-20), 7.51 (d, $J=16.44$ Hz, 1H, H-31), 7.09 (d, $J=9.22$ Hz, 1H, H-1), 6.98-6.78 (m, 4H, H-25, H-29, H-30, H-10), 4.00-3.95 (s, 9H, H-35, H-36, H-37), 3.95-3.92 (s, 3H, H-11)

2.2.8 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 8

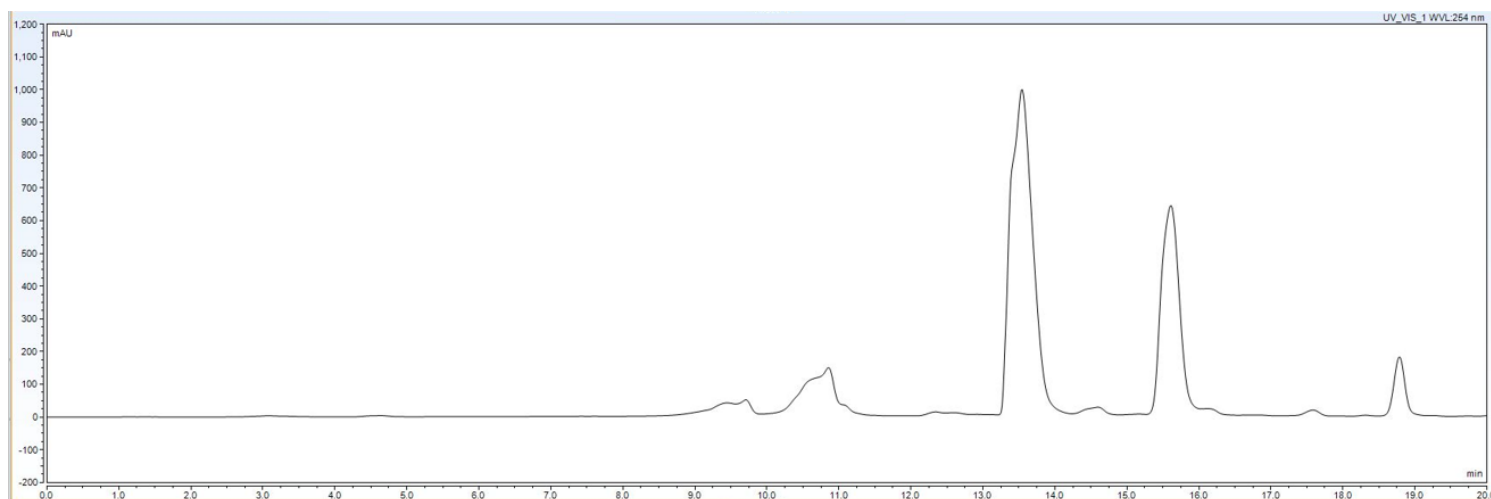


Εικόνα 45. Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 8

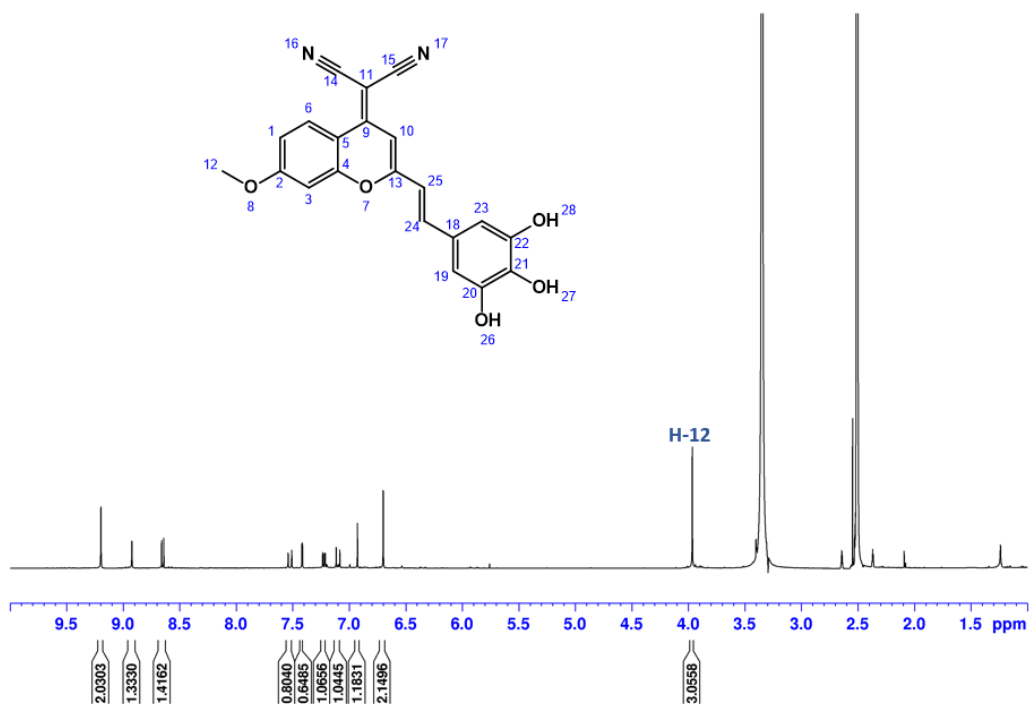
Πειραματική πορεία

Για την απομάκρυνση των μεθυλομάδων και την απομόνωση της ένωσης 8 χρησιμοποιήθηκε BBr₃.

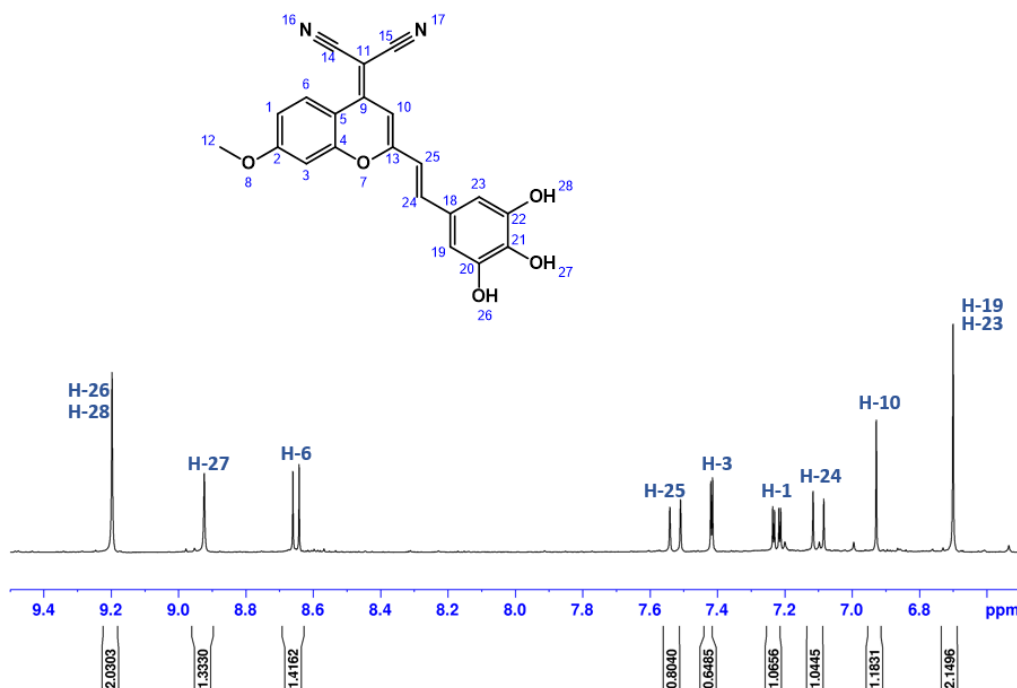
Σε διάλυμα της ένωσης 8 (22mg, 0.052 mmol) στους -83°C (με χρήση παγωμένου οξικού αιθυλεστέρα) σε 2ml άνυδρου DCM έγινε προσθήκη του BBr₃ (78.64 μl, 0.46 mmol) και το διάλυμα της αντίδρασης ήρθε αργά σε θερμοκρασία δωματίου όπου και αναδεύτηκε για 15 ώρες. Ακολούθως ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα της αντίδρασης καθαρίστηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε σύστημα που διήρκησε 20 λεπτά από 20% (ACN / H₂O) έως 95% (ACN / H₂O). Η λάμπα του UV ρυθμίστηκε στα 254 nm, η ροή στα 20 ml / min και το επιθυμητό προϊόν συλλέχθηκε στα 13,5 λεπτά. Το διάλυμα από την HPLC τοποθετήθηκε στην λυοφιλοποίηση για την απομάκρυνση του H₂O και η επιθυμητή ένωση απομονώθηκε ως πορτοκαλί στερεό με συνολική απόδοση 20% (5 mg).



Εικόνα 46. Χρωματογράφημα καθαρισμού της ένωσης 8 σε σύστημα που διήρκησε 20 λεπτά από 20% (ACN / H₂O) έως 95% (ACN / H₂O)

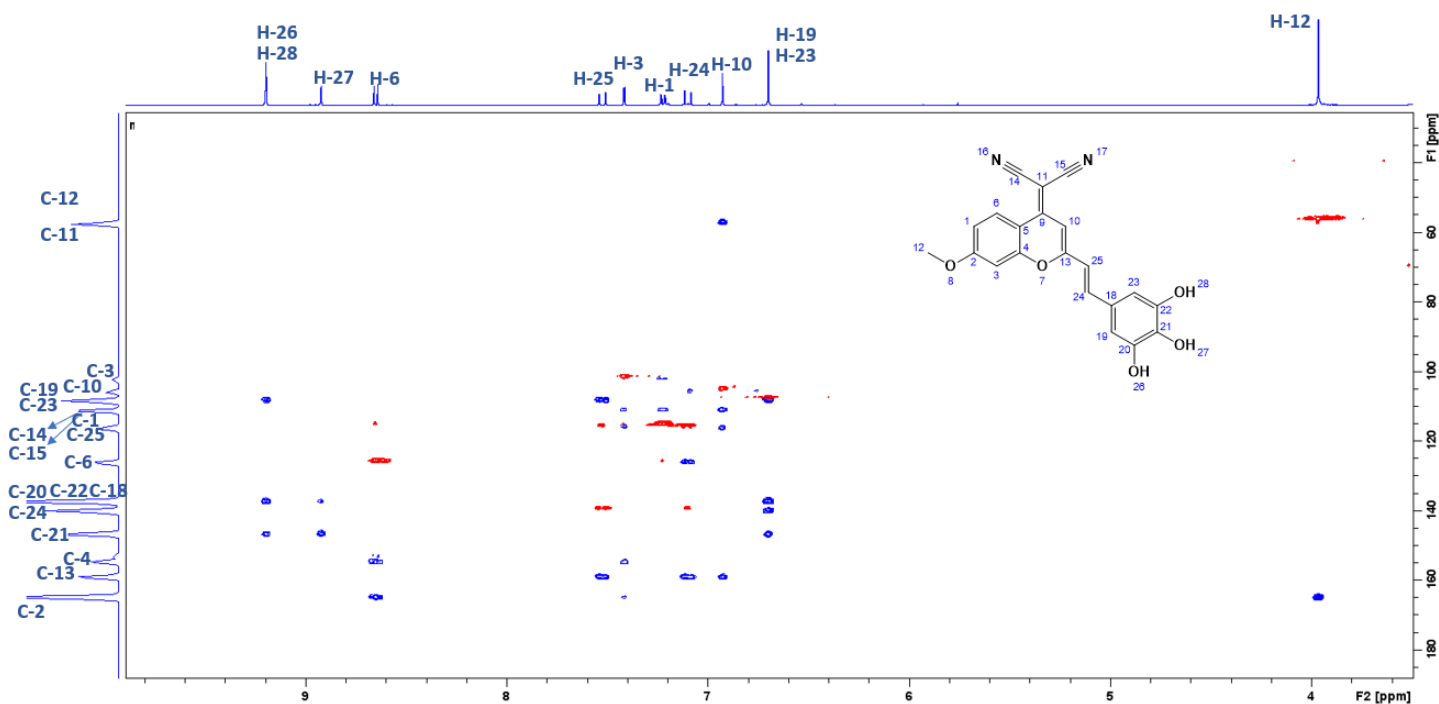


Εικόνα 47. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 8 σε DMSO-d_6 (400 MHz, 25 °C)



Εικόνα 48. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 8 σε DMSO-d_6 (400 MHz, 25 °C) (εστίαση στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων)

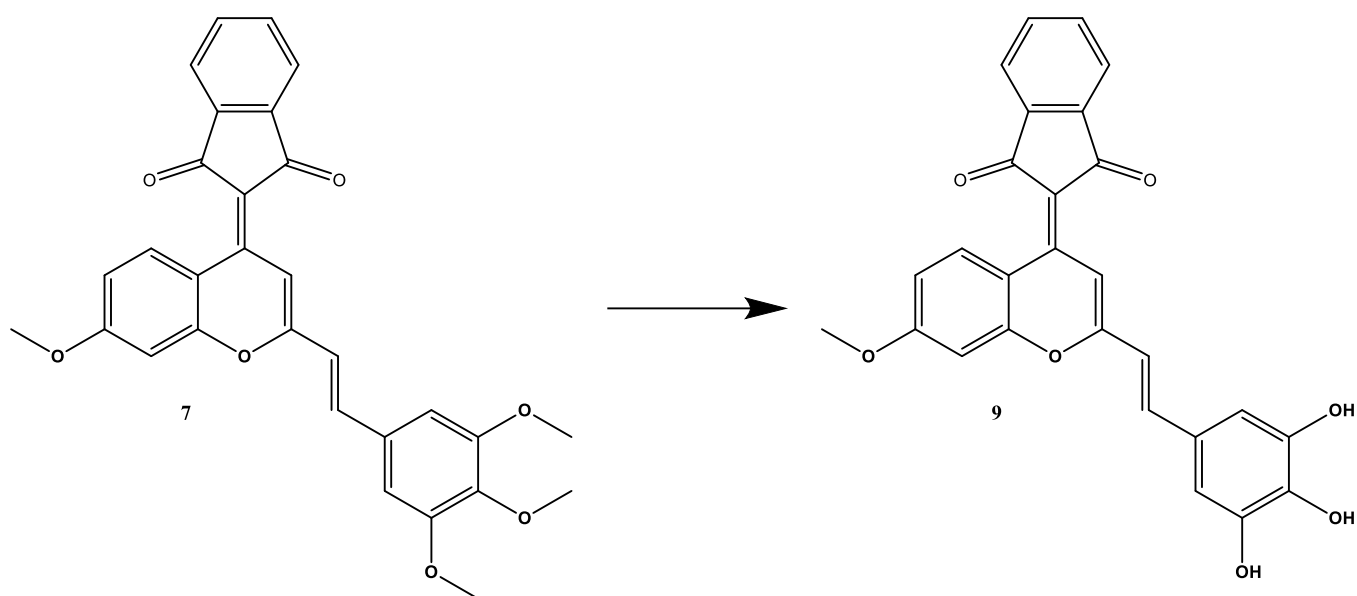
^1H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ : 8.64 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, H-6), 7.51 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H, H-25), 7.42 (s, 1H, H-3), 7.21 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, H-1), 7.10 (d, $J=16.1$ Hz, 1H, H-24), 6.92 (s, 1H, H-10), 6.69 (s, 2H, H-19, H-23), 3.96 (s, 3H, H-12)



Εικόνα 49. Υπέρθεση φασμάτων $2\text{D } ^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC (κόκκινο)-HMBC (μπλε) της ένωσης 8 σε DMSO-d_6 (500 MHz, 25°C)

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ : 165.2 (C-2), 159.1 (C-13), 155.21 (C-4), 146.2 (C-21), 140.1 (C-24), 137.6 (C-20, C-22, C-18), 125.9 (C-6), 116.0 (C-25, C-1), 111.1 (C-14, C-15), 107.9 (C-19, C-23), 105.8 (C-10), 102.2 (C-3), 57.1 (C-11, C-12)

2.2.9 Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 9

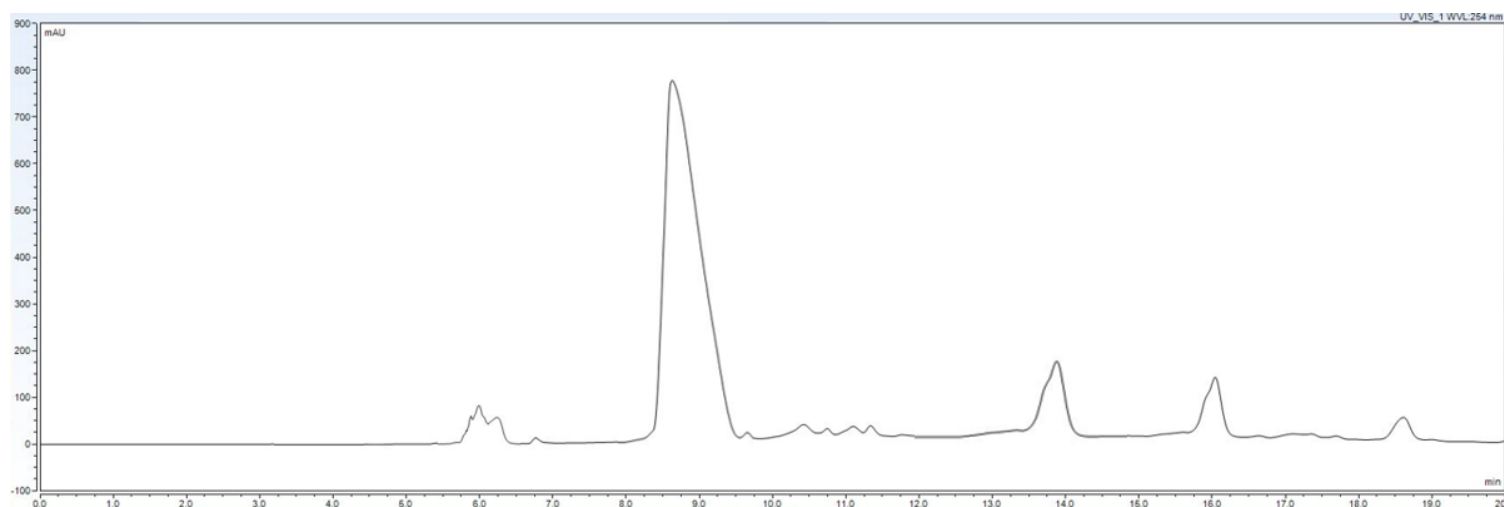


Εικόνα 50. Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 9

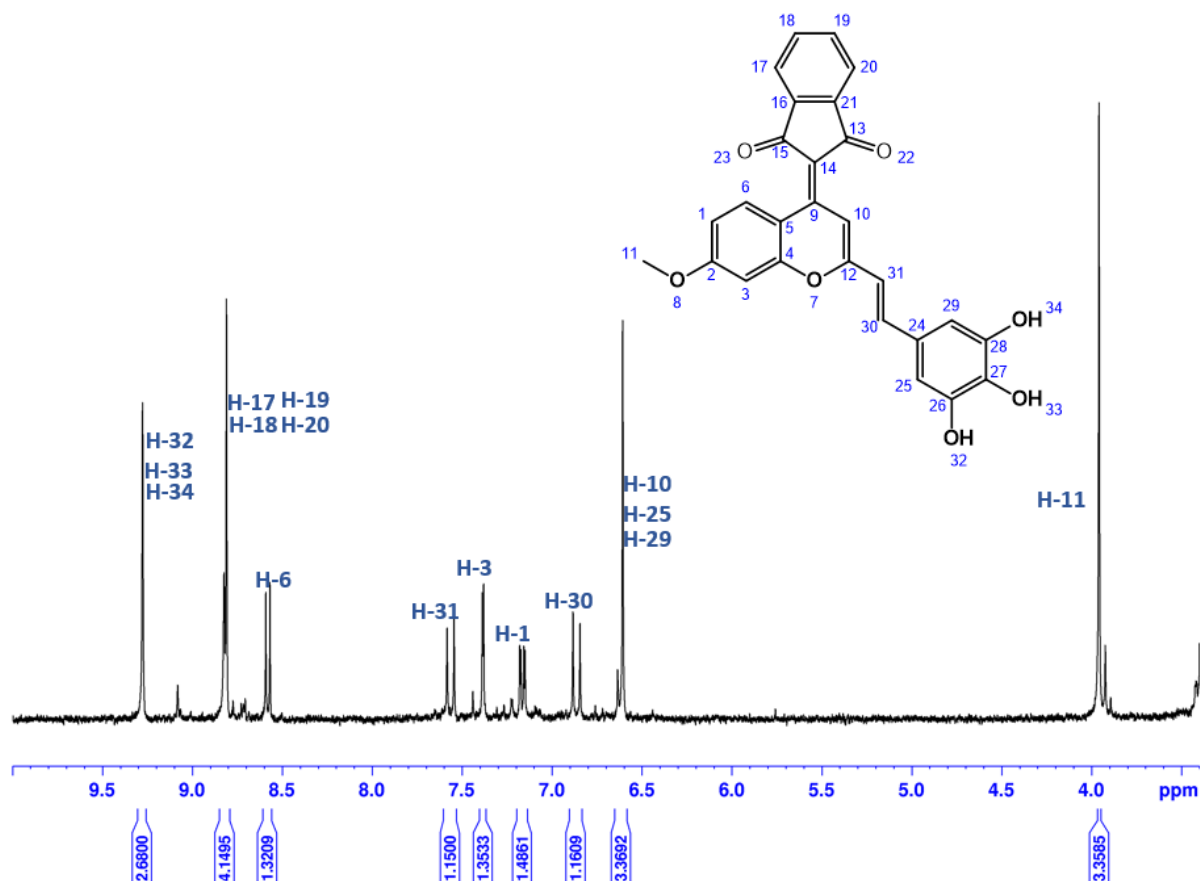
Πειραματική πορεία

Για την απομάκρυνση των μεθυλομάδων και την απομόνωση της ένωσης 9 χρησιμοποιήθηκε BBr₃.

Σε διάλυμα της ένωσης 7 (25mg, 0.049 mmol) στους -83°C (με χρήση παγωμένου οξικού αιθυλεστέρα) σε 2ml άνυδρου DCM έγινε προσθήκη του BBr₃ (78.64 μl, 0.46 mmol) και το διάλυμα της αντίδρασης ήρθε αργά σε θερμοκρασία δωματίου όπου και αναδεύτηκε για 15 ώρες. Ακολούθως ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα της αντίδρασης καθαρίστηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε σύστημα που διήρκεσε 20 λεπτά από 25% (ACN / H₂O) έως 95% (ACN / H₂O). Η λάμπα του UV ρυθμίστηκε στα 254 nm, η ροή στα 20 ml /min και το επιθυμητό προϊόν συλλέχθηκε στα 8,7 λεπτά. Το διάλυμα από την HPLC τοποθετήθηκε στην λυοφιλοποίηση για την απομάκρυνση του H₂O και η επιθυμητή ένωση απομονώθηκε ως πορτοκαλί-κίτρινο στερεό με συνολική απόδοση 21,5% (5,5 mg).



Εικόνα 51. Χρωματογράφημα καθαρισμού της ένωσης 8 σε σύστημα που διήρκεσε 20 λεπτά από 20% (ACN / H₂O) έως 95% (ACN / H₂O)



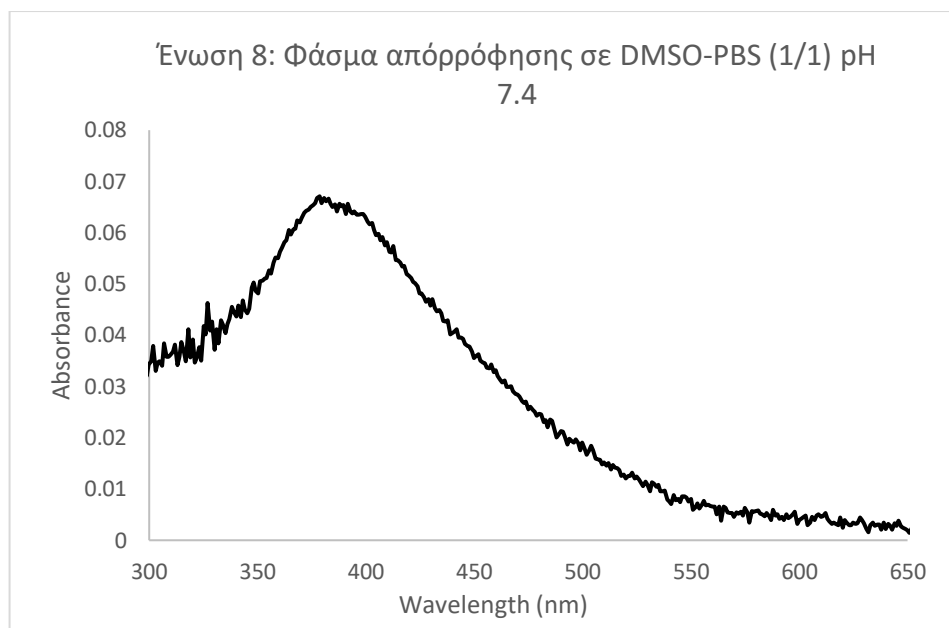
Εικόνα 52. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 9 σε DMSO-d_6 (400 MHz, 25 °C)

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6) δ : 9.30 (s, 3H, H-32, H-33, H-34), 8.81 (m, 4H, H17, H-18, H-19, H-20), 8.59 (d, $J = 9.35$ Hz, 1H, H-6), 7.60 (d, $J = 16.1$ Hz, 2H- H-31), 7.39 (s, 1H, H-3), 7.18 (d, $J = 9.35$ Hz, 1H, H-1), 6.87 (d, $J = 16.1$ Hz, 2H- H-30), 6.61-6.55 (m, 3H, H-10, H-25, H-29), 3.98 (s, 3H, H-11)

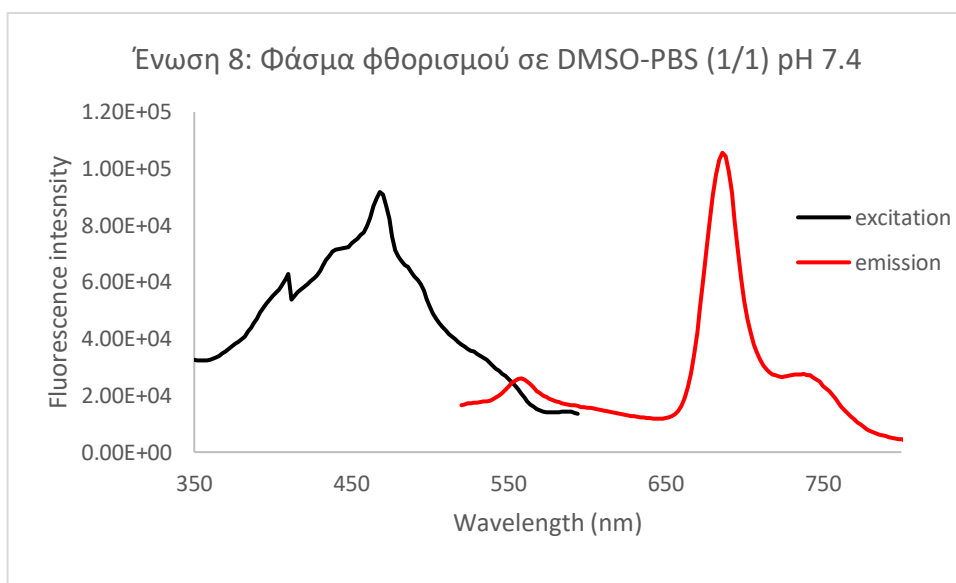
2.2.10 Φωτοφυσικές ιδιότητες της Ένωσης 8

Για την ένωση 8, η οποία φαίνεται πως αναστέλλει αποτελεσματικά το σχηματισμό του συμπλόκου Mgc-Max, προχωρήσαμε σε αξιολόγηση των φωτοφυσικών ιδιοτήτων της.

Προκειμένου να αξιολογήσουμε τις φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης 8, 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), σε pH 7.4, για να μελετήσουμε τις φασματικές 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 382 nm. Επίσης, μελετήθηκαν τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής με λ_{exc} 470 nm και λ_{em} 688 nm. Τέλος, υπολογίστηκε η μετατόπιση Stokes ίση με 218 nm.



Εικόνα 53. Φάσμα απορρόφησης σε DMSO-PBS (1/1) pH=7.4 της ένωσης 8 (25°C)



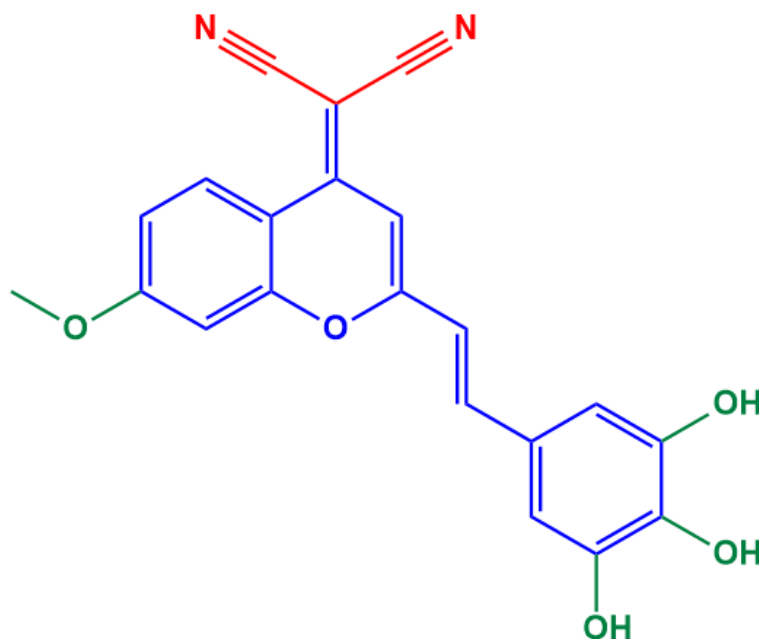
Εικόνα 54. Φάσμα φθορισμού σε DMSO-PBS (1/1) pH=7.4 της ένωσης 8 (10μM) (25°C). Με μαύρο χρώμα απεικονίζεται το φάσμα διέγερσης και με κόκκινο το φάσμα εκπομπής

Πίνακας 1. Μήκη κύματος απορρόφησης, διέγερσης, εκπομπής και μετατόπιση Stokes της ένωσης 8

λ_{abs} (nm)	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emission}}$ (nm)	Stokes shift (nm)
382	470	688	114

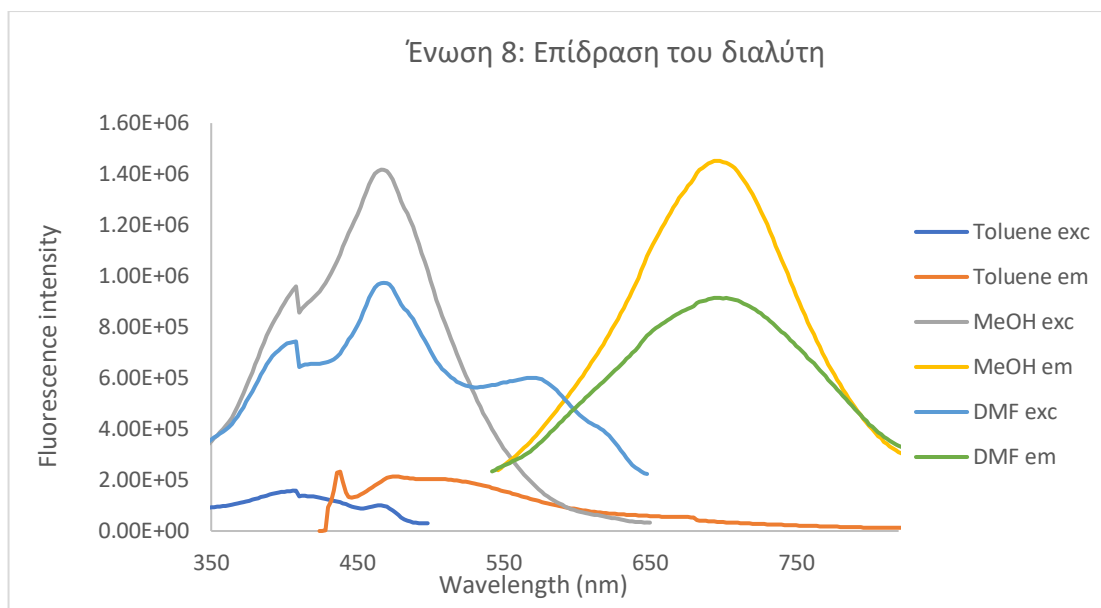
2.2.10.1 Επίδραση του διαλύτη

Η συγκεκριμένη ένωση παρουσιάζει ομάδες δότη και δέκτη, είναι, δηλαδή, φθοροφόρο push-pull (ώθησης - έλξης) (**Εικόνα 55**). Η δομή ώθησης-έλξης διασφαλίζει ότι μετά την απορρόφηση φωτός το φορτίο μεταφέρεται από την ομάδα δότη στην ομάδα δέκτη, γεγονός που δημιουργεί μία εξαιρετικά διπολική κατάσταση διεγέρσεως. Κατά την αποδιέγερση γίνεται αλληλεπίδραση με δίπολα του διαλύτη και έτσι η εκπομπή του μετατοπίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος σε πιο πολικούς διαλύτες.



Εικόνα 55. Η δομή της ένωσης **8** όπου επισημαίνονται με πράσινο χρώμα οι δότες ηλεκτρονίων, με κόκκινο χρώμα οι δέκτες ηλεκτρονίων και με μπλε χρώμα ο συνδέτης

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα της ένωσης **8** (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).



Εικόνα 56. Φάσματα εκπομπής και διέγερσης της ένωσης 8 (10μM) σε διάφορους διαλύτες (τολουόλιο, μεθανόλη, N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο) (25°C)

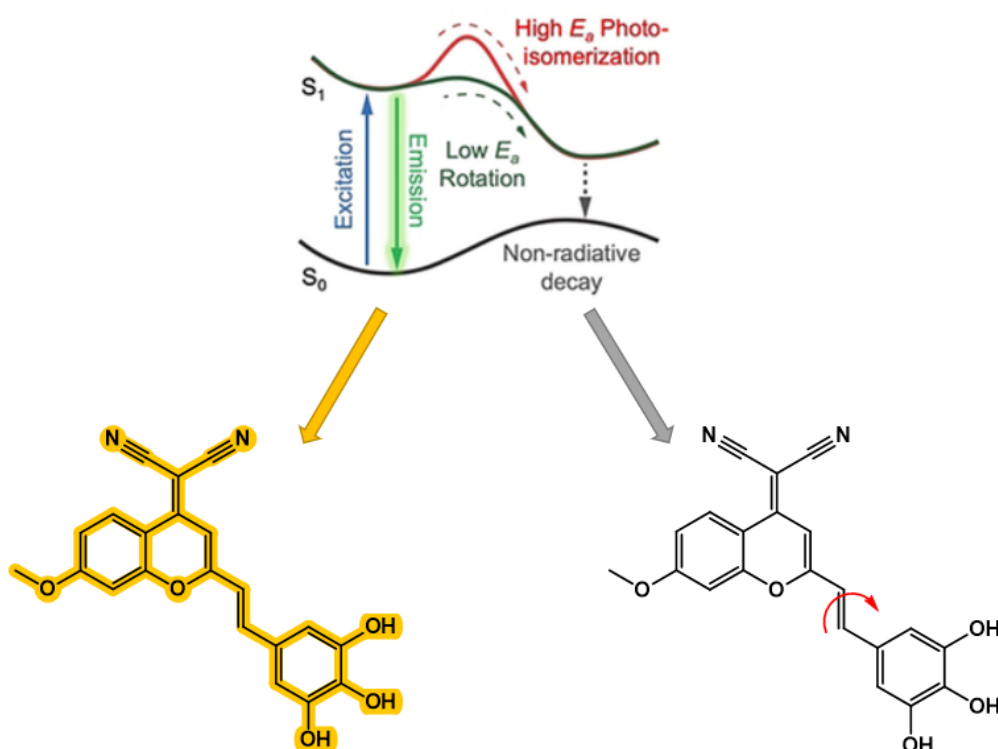
Πίνακας 2. Μήκη κύματος απορρόφησης και εκπομπής της ένωσης 17 συναρτήσει του διαλύτη

Διαλύτης	λ exc (nm)	λ em (nm)
Τολουόλιο (toluene) Μη πολικός διαλύτης	414	506
Διμεθυλφορμαμίδιο (dimethylformamide) Πολικός απρωτικός διαλύτης	470	702
Μεθανόλη (methanol) Πολικός πρωτικός διαλύτης	474	714

2.2.10.2 Ανταπόκριση στο ιζώδες

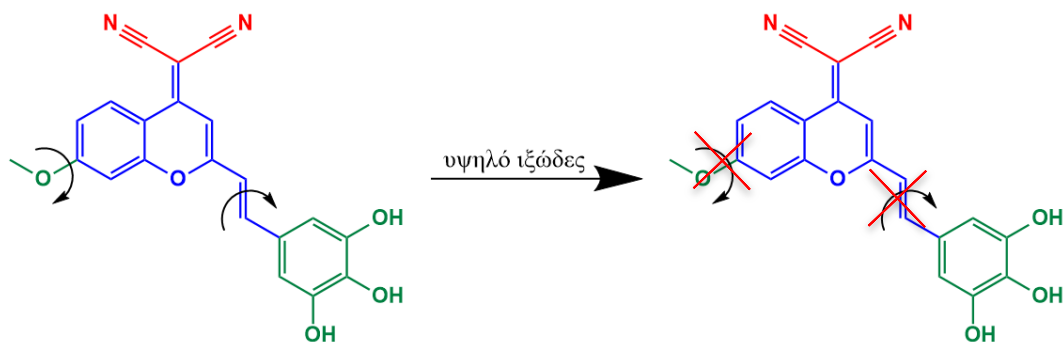
Επιπρόσθετα, για να αξιολογήσουμε την απόκριση της ένωσης **8** στη μεταβολή του ιζώδους πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού χρησιμοποιώντας διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού (από 0% έως 99%) [99]. Όπως βλέπουμε και στην **Εικόνα 57**, τα

διεγερμένα φθοροφόρα αυτού του τύπου μπορούν να επιστρέψουν στη θεμελιώδη κατάσταση μέσω φθορισμού ή μέσω περιστροφής που οδηγεί σε μη φθορίζουσα διάταξη [100].



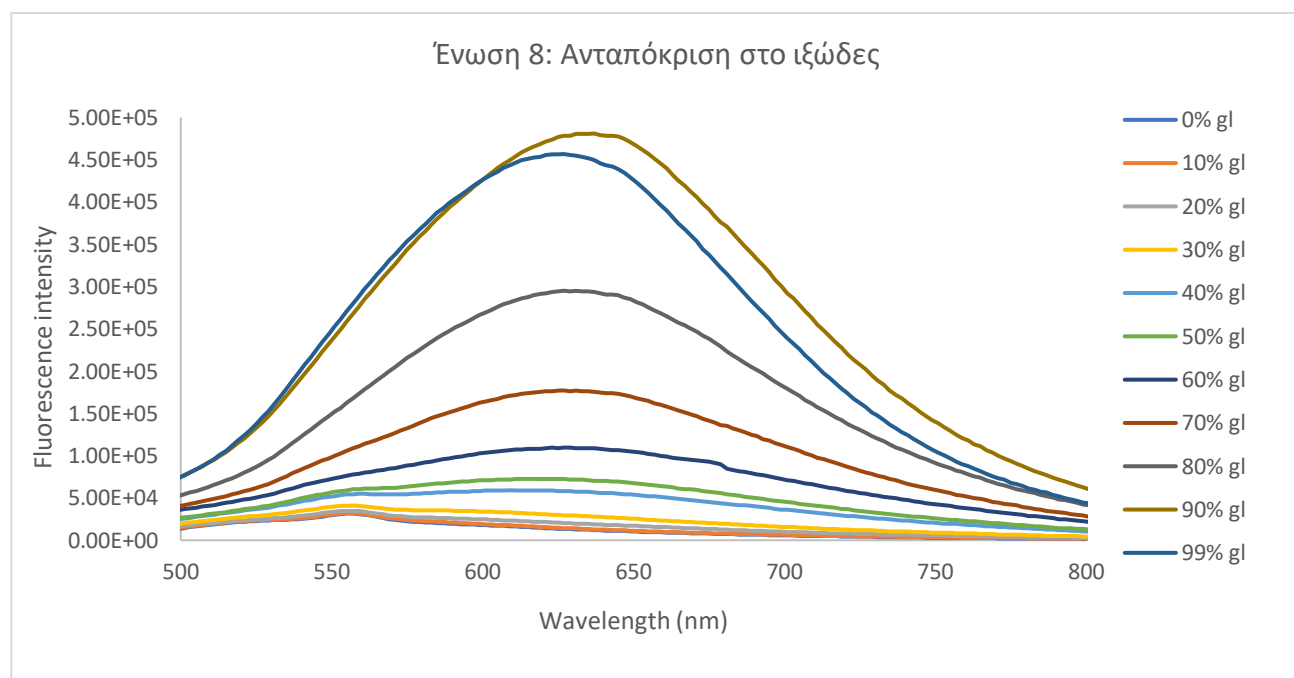
Εικόνα 57. Δυνατότητες αποδιέγερσης: μέσω φθορισμού (αριστερά), μέσω μη-φθορίζουσας αποδιέγερσης λόγω περιστροφής (δεξιά)

Η ένωση **8** σε υδατικά μέσα εμφανίζει ένα ασθενές σήμα φθορισμού. Με σταδιακή αύξηση του ποσοστού γλυκερόλης, παρατηρήθηκε ότι το σήμα φθορισμού αυξήθηκε σημαντικά (~ **40 φορές**) (**Εικόνα 59**). Επίσης, παρατηρείται και μετατόπιση του φάσματος φθορισμού σε μεγαλύτερα μήκη κύματος όσο αυξάνεται το ποσοστό της γλυκερόλης.



Εικόνα 58. Περιστροφή των ομάδων σε συνθήκες χαμηλού ιξώδους (αριστερά) και παρεμπόδιση αυτής της διαδικασίας σε συνθήκες υψηλού ιξώδους (δεξιά)

Παρόμοιο αποτέλεσμα (με την αύξηση του ιξώδους και την παρεμπόδιση της περιστροφής) μπορεί να συναντηθεί όταν η ένωση αλληλεπιδράσει με μία πρωτεΐνη, όπως για παράδειγμα με την Myc. Μπορούμε, δηλαδή, να υποθέσουμε ότι η ένωση θα λειτουργήσει ως αναστολέας του σχηματισμού του συμπλόκου Myc-Max και παράλληλα θα αυξήσει το φθορισμό της.

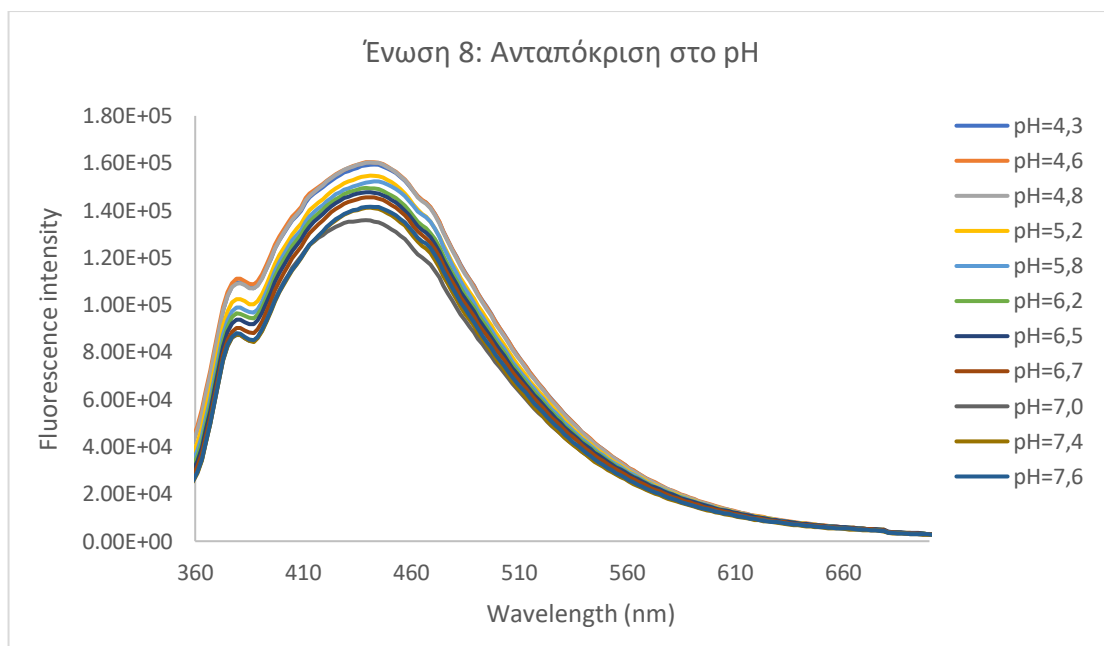


Εικόνα 59. Φάσματα φθορισμού της ένωσης 8 (10μΜ) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης-νερού (από 0% έως 99% γλυκερόλη) κατόπιν διέγερσης στα 450 nm (25°C)

Λόγω της μετατόπισης του σήματος φθορισμού σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (553 nm → 648 nm), μπορούμε να υποθέσουμε ότι η ένωση **8** ακολουθεί το φαινόμενο TICT.

2.2.10.3 Επίδραση του pH

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] [101]. Οι μετρήσεις έγιναν σε διαλύματα DMSO-PBS (1/3) στους 25°C με τελική συγκέντρωση της ένωσης στα 10uM. Από τα αποτελέσματα παρατηρούμε αύξηση της έντασης φθορισμού όσο μειώνεται το pH, αλλά χωρίς κάποια σημαντική μεταβολή με αποτέλεσμα η ένωση να μη μπορεί να λειτουργήσει ως «μάρτυρας» για μεταβολές του pH.

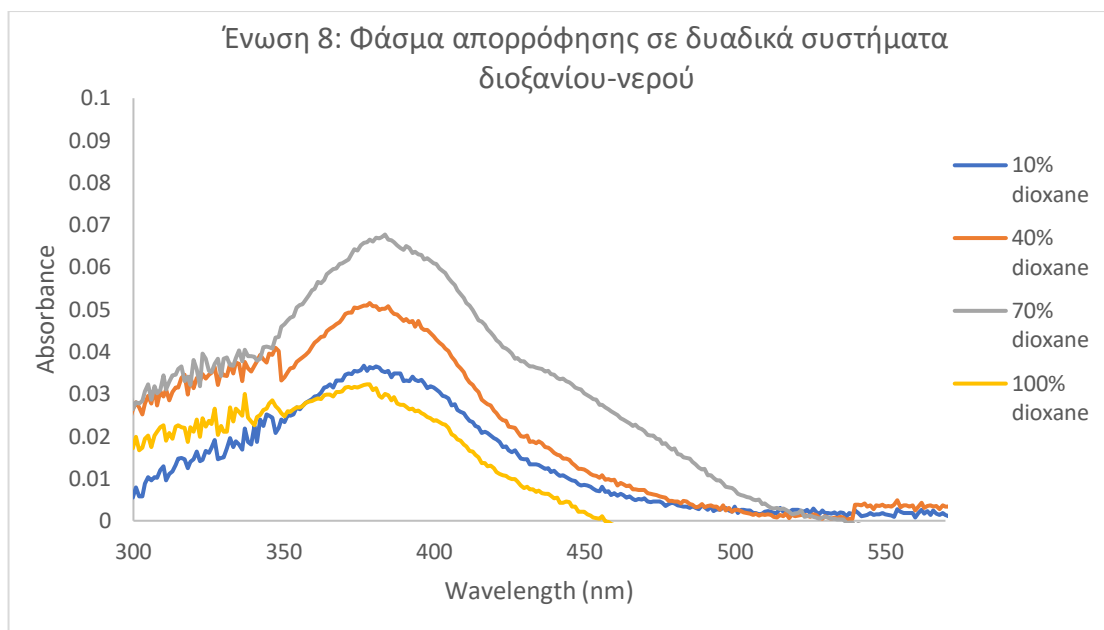


Εικόνα 60. Φάσματα φθορισμού της ένωσης 8 (10 μ M) σε διαφορετικά επίπεδα pH κατόπιν διέγερσης στα 450 nm (25°C)

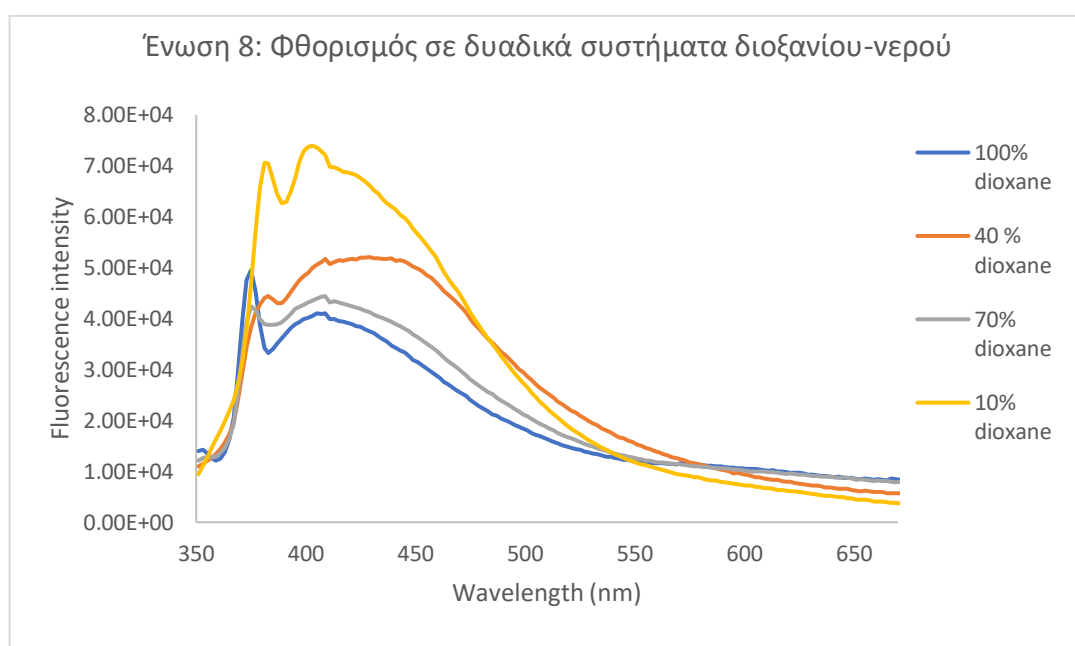
2.2.10.4 Ανταπόκριση στις μεταβολές της πολικότητας

Η πολικότητα είναι μία σημαντική παράμετρος του μικροπεριβάλλοντος. Στα βιολογικά συστήματα, και ειδικά σε κυτταρικό επίπεδο, η τοπική πολικότητα μπορεί να επηρεάσει το μεταβολισμό, τη σταθερότητα διαμοριακών συμπλόκων και πολλά άλλα [102].

Για το λόγο αυτό, ερευνήσαμε την ικανότητα της ένωσης **8** στο να ανιχνεύει αλλαγές στην πολικότητα. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού σε κάποια ενδεικτικά δυαδικά συστήματα 1,4-διοξανίου-νερού (10%, 40%, 70%, 100% διοξάνιο), όπου η διηλεκτρική σταθερά (ϵ) ελαττώνεται.



Εικόνα 61. Φάσματα απορρόφησης της ένωσης 8 ($10\mu\text{M}$) σε διάφορα συστήματα 1,4-διοξανίου-νερού (25°C)

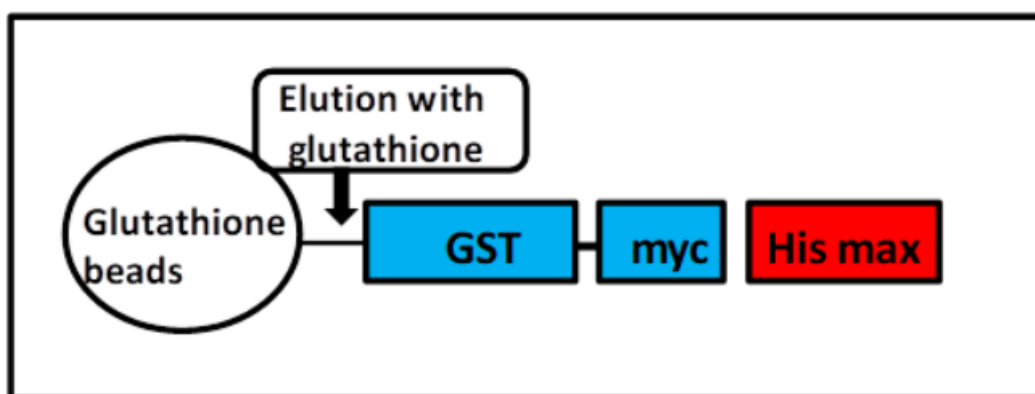


Εικόνα 62. Φάσματα φθορισμού της ένωσης 8 ($10\mu\text{M}$) σε διάφορα συστήματα 1,4-διοξανίου-νερού (25°C)

Όπως φαίνεται στα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού, η ένωση **8** δεν εμφανίζει κάποια σημαντική αλλαγή λόγω μεταβολών της πολικότητας.

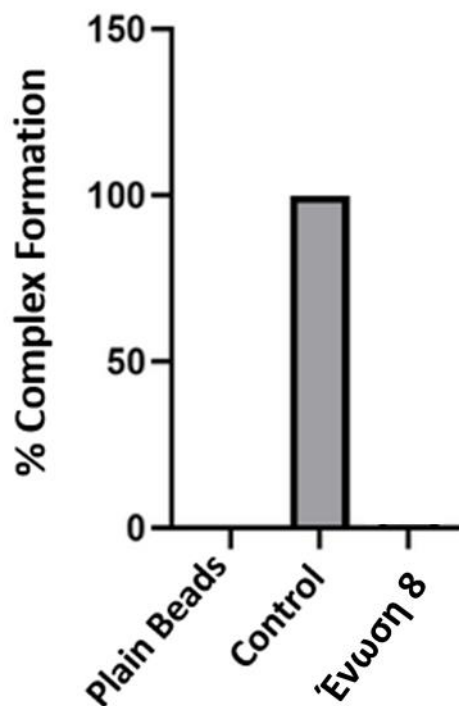
2.2.11 Αξιολόγηση των ενώσεων 8 και 9 ως προς την ικανότητα αναστολής σχηματισμού του συμπλόκου Myc- Max

Προκειμένου να αξιολογηθεί η ικανότητα της ένωσης **8** να αναστέλλει τον σχηματισμό του συμπλόκου Myc – Max, στο πλαίσιο συνεργασίας της ερευνητικής μας ομάδας με αυτή του κ. Χριστοφορίδη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα όπου, σφαιρίδια γλουταθειόνης στα οποία έχουν προσδεθεί ποσότητες GST-myc επωάζονται με 6 His-max. Στη συνέχεια πραγματοποιείται έκλουση με ανηγμένη γλουταθειόνη (**Εικόνα 63**). Σαν αρνητικό control, η 6His-max επωάζεται με κενά σφαιρίδια (plain beads) γλουταθειόνης, προκειμένου να ελεγχθεί η μη ειδική σύνδεσή της με τα σφαιρίδια. Τα κλάσματα της έκλουσης ελέγχονται με πηκτή πολυακρυλαμίδιου, ανοσοαποτύπωση και χρήση αντισώματος έναντι της Max.



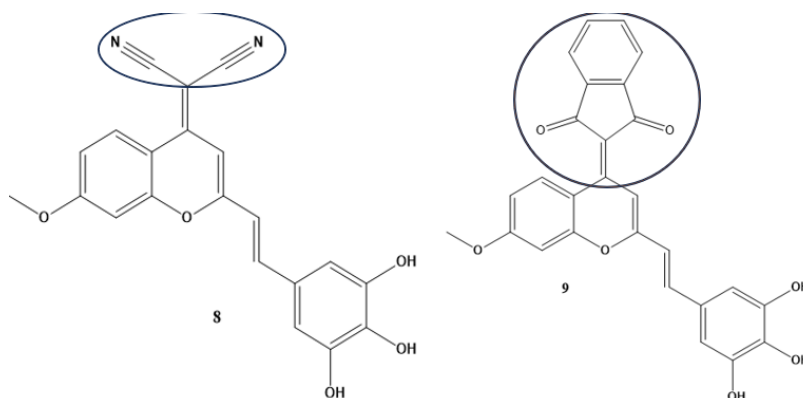
Εικόνα 63. Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής προσέγγισης σχηματισμού του συμπλόκου GSTmyc - 6HisMax

Στην περίπτωση ελέγχου της δράσης πιθανών αναστολέων της Myc γίνεται μια προεπάση αυτής με το εκάστοτε οργανικό μόριο και στη συνέχεια προστίθεται η Max. Πραγματοποιείται και πάλι έκλουση με ανηγμένη γλουταθειόνη και τα κλάσματα ελέγχονται με πηκτή πολυακρυλαμίδιου, ανοσοαποτύπωση και χρήση αντισώματος έναντι της Max (**Εικόνα 63**). Όταν κάποιο χημικό μόριο έχει ανασταλτική δράση τότε ανάλογα με την ένταση της δράσης του προσδένεται μικρότερη ποσότητα Max οπότε και παρατηρείται μείωση στο σήμα της αντίστοιχης μπάντας. Στην **Εικόνα 64** φαίνεται ότι για την ένωση **8** εμφανίζεται πολύ μικρή ένταση στο σήμα της ανοσοαποτύπωσης γεγονός που αποδεικνύει ότι προσδένεται πολύ ισχυρά με την πρωτεΐνη Myc αποτρέποντας τον σχηματισμό του συμπλόκου με την Max.

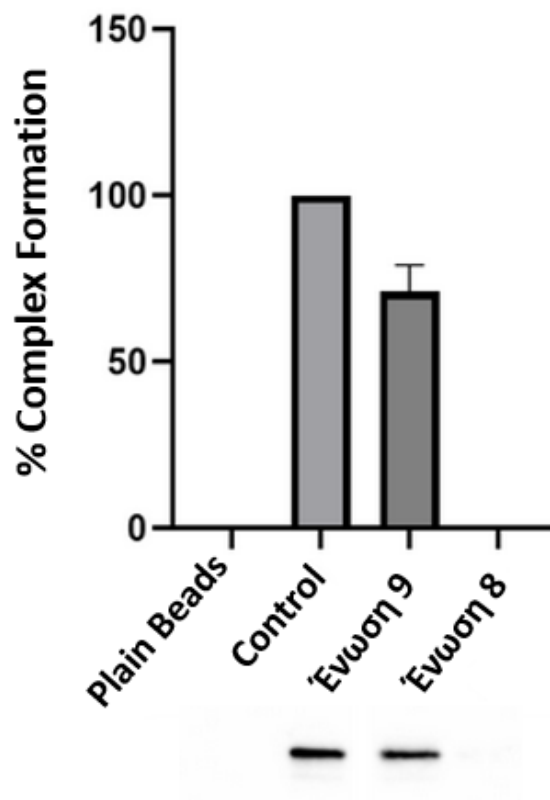


Εικόνα 64. Ποσοστό σχηματισμού του συμπλόκου με κενά σφαιρίδια γλουταθειόνης, χωρίς προεπώαση με την ένωση 8, έπειτα από προεπώαση με την ένωση 8 καθώς και η ανοσοαποτύπωση με χρήση αντισώματος έναντι της Max

Σύμφωνα με το άρθρο [103], οι νίτριλο-ομάδες ($-C\equiv N$) παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση μορίων σε πρωτεΐνες, λόγω αλληλεπιδράσεων που σχηματίζουν όπως οι δεσμοί υδρογόνου. Στην προσπάθειά μας να εντοπίσουμε δομικό μοτίβο για την ανάπτυξη αναστολέων του σχηματισμού του ετεροδιμερούς Mgc-Max, σχεδιάσαμε την ένωση **9** που διαφέρει σε σχέση με την ένωση **8** καθώς αντί για τις νίτριλο ομάδες, έχει ενσωματωθεί το μόριο 1,3-indanedione.



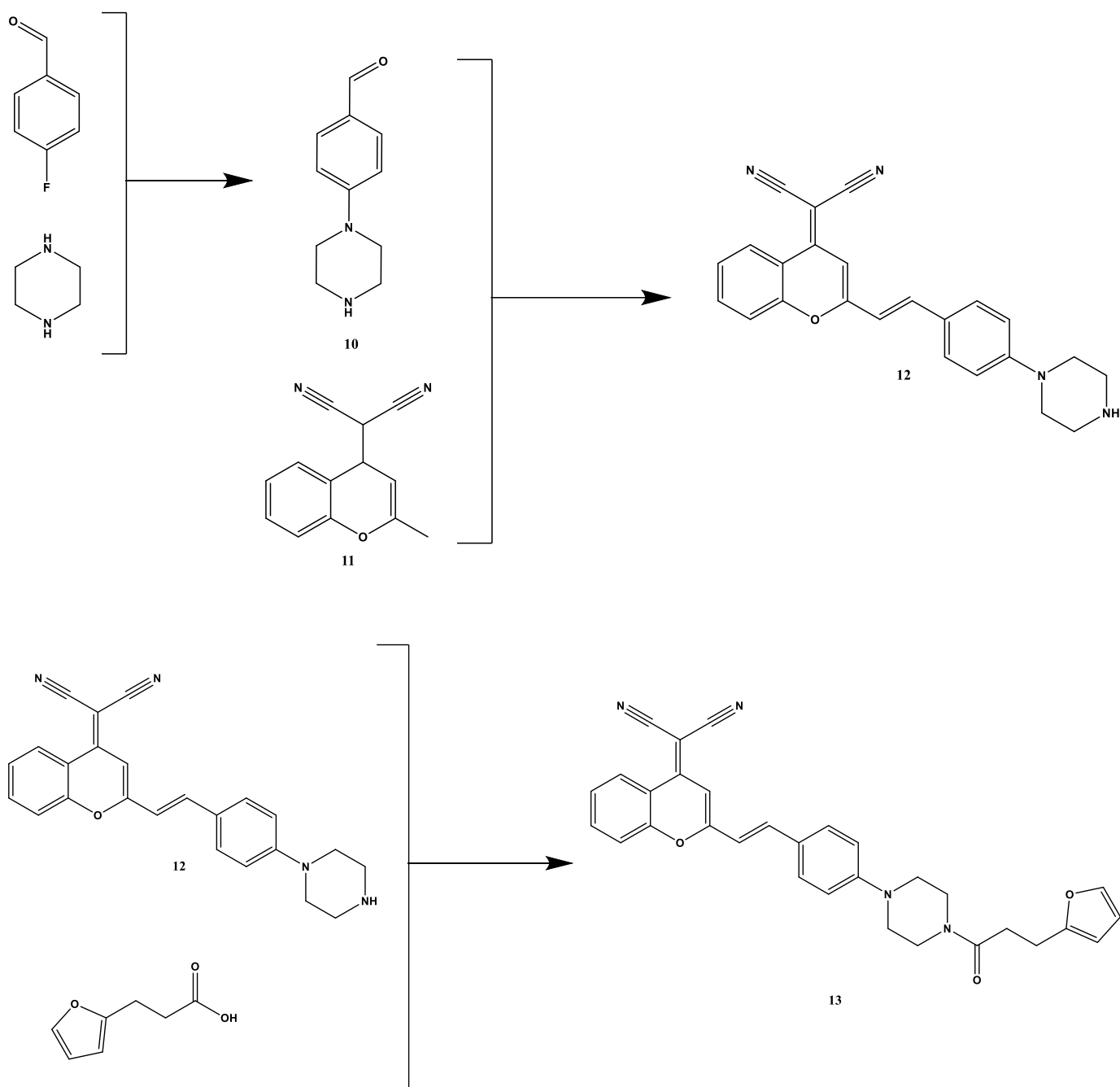
Εικόνα 65. Δομικές διαφορές ενώσεων 8 και 9



Εικόνα 66. Ποσοστό σχηματισμού του συμπλόκου με κενά σφαιρίδια γλουταθειόνης, χωρίς προεπώαση με τις ενώσεις 8 και 9, έπειτα από προεπώαση με τις ενώσεις 8 και 9 καθώς και η ανοσοαποτύπωση με χρήση αντισώματος έναντι της Max

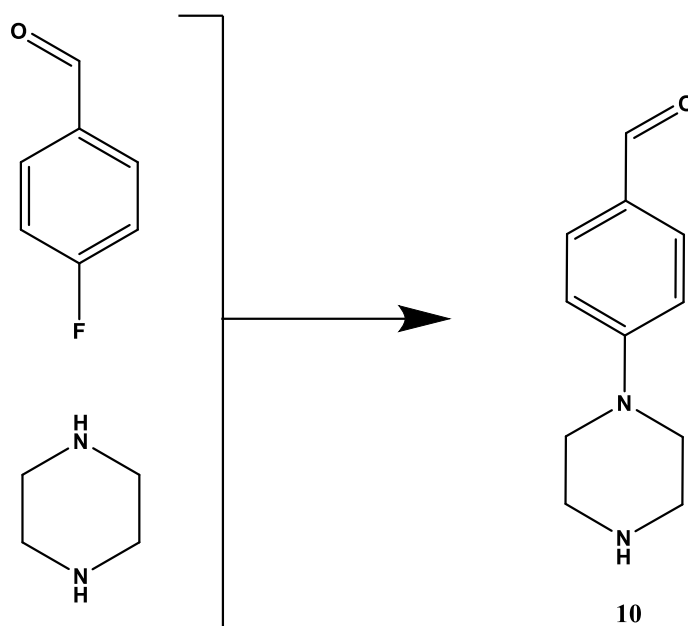
Παρατηρούμε ότι σε σχέση με την ένωση 8, η ένωση 9 δεν έχει αξιόλογη ανασταλτική δράση.

2.3 Σύνθεση και αξιολόγηση πιθανού αναστολέα του σχηματισμού του συμπλόκου Mgc-Max (ένωση 13)



Εικόνα 67. Απεικόνιση της συνθετικής πορείας για τη σύνθεση της ένωσης 13

2.3.1 Σύνθεση της ένωσης 10

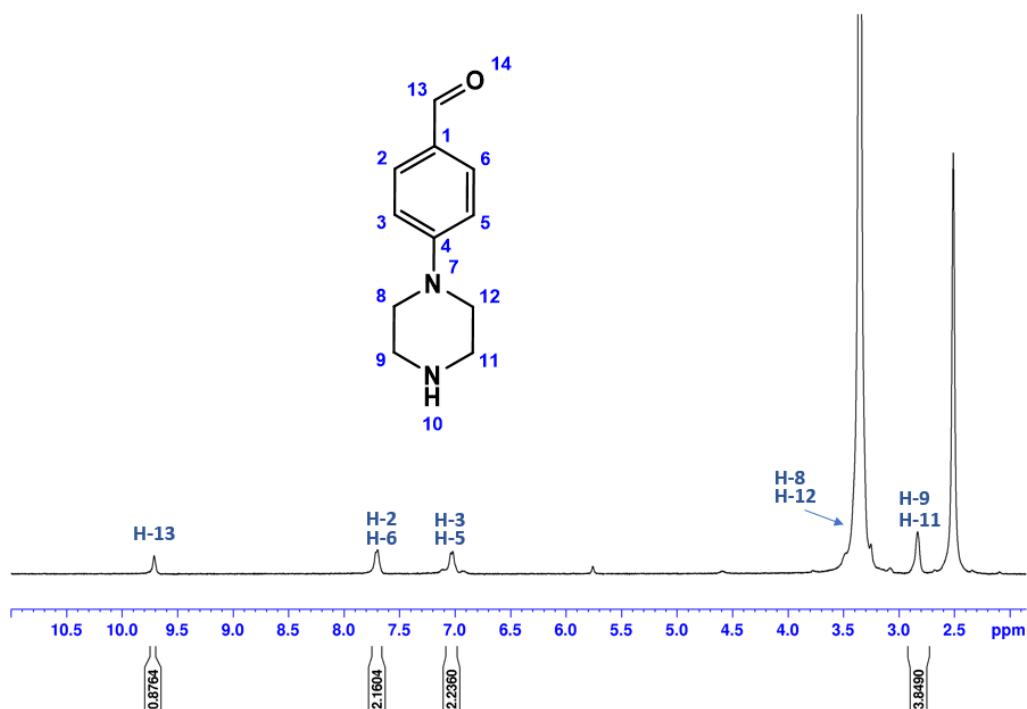


Εικόνα 68. Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 10

Πειραματική πορεία

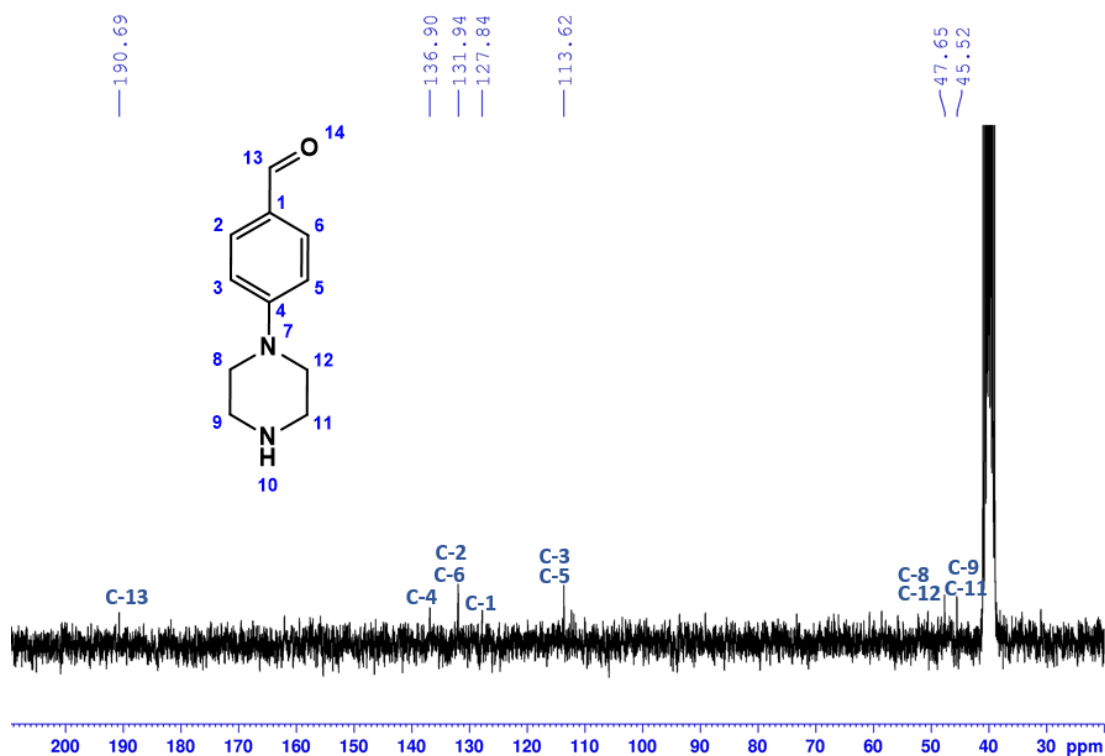
Η πιπεραζίνη (3 g, 34.2 mmol) μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη των 25 ml και διαλύθηκε στο μίγμα διαλυτών νερό/μονομεθυλαιθέρας της τριαιθυλένο γλυκόλης (3/4). Ακολούθησε προσθήκη της 4-φθοροβενζαλδεΐδης (1.24 ml, 11.5 mmol). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση και θέρμανση σε επαναρροή για 3 ώρες, σε συνθήκες αζώτου.

Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC σε διχλωρομεθάνιο, όπου και διαπιστώθηκε η ολοκλήρωσή της. Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου, οπότε και άρχισε να σχηματίζεται ένα κίτρινο στερεό. Το στερεό φιλτραρίστηκε και εκπλύθηκε με νερό. Στη συνέχεια το στερεό διαλύθηκε σε υδατικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 10%. Το pH του διαλύματος, έπειτα, ρυθμίστηκε στο 10 με προσθήκη διαλύματος NaOH. Τέλος, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο/νερό όπου συλλέχθηκαν οι οργανικές φάσεις, οι οποίες ξηράνθηκαν με άνυδρο Na_2SO_4 , συμπυκνώθηκαν με εξάτμιση υπό υψηλό κενό και το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε σαν κίτρινο στερεό με απόδοση 59% (1.33 g).



Εικόνα 69. Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 10 σε $\text{DMSO}-d_6$ (400 MHz, 25 °C)

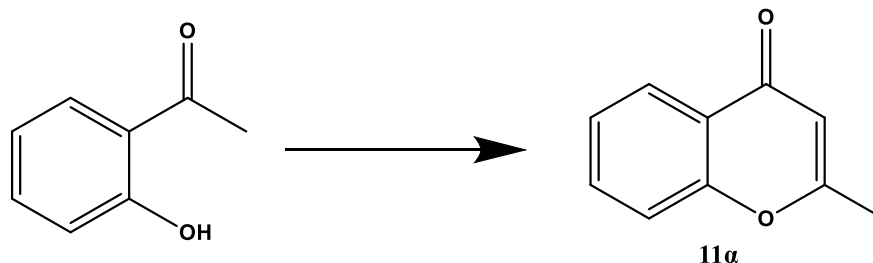
^1H NMR (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.70 (s, 1H, H-13), 7.70 (d, $J=6.40$ Hz, 2H, H-2, H-6), 7.02 (d, $J=6.40$ Hz, 2H, H-3, H-5), 3.35-3.33 (s, 4H, H-8, H-12), 2.81 (s, 4H, H-9, H-11)



Εικόνα 70. Φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης 10 σε $\text{DMSO}-d_6$ (101 MHz, 25 °C)

^{13}C NMR (63 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_6$) δ : 190.69 (C-7), 136.90 (C-4), 131.94 (C-2, C-6), 127.84 (C-1), 113.62 (C-3, C-5), 47.65 (C-8, C-12), 45.52 (C-9, C-11)

2.3.2 Σύνθεση της ένωσης 11α



Εικόνα 71. Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 11α

Πειραματική πορεία

Για τη σύνθεση της ένωσης 11α, αρχικά με μια αντίδραση Claisen με τη χρήση μεταλλικού νατρίου και άνυδρου οξικού αιθυλεστέρα προέκυψε ενδιάμεσο προϊόν δικετόνης (δεν απομονώθηκε). Στη συνέχεια έγινε αντίδραση με μεθανόλη και πυκνό υδροχλωρικό οξύ (καταλυτική ποσότητα) και με ενδομοριακή αντίδραση αλδολικής συμπύκνωσης, προέκυψε η 2-μέθυλο χρωμόνη.

Αναλυτικά:

Η 2-υδροξυ-ακετοφαινόνη (200 mg g, 0.61 mmol) διαλύθηκε σε οξικό αιθυλεστέρα. Ακολούθησε προσθήκη νατρίου (0.1 g, 0.44 mmol) (έχει το ρόλο της βάσης). Η αντίδραση αφέθηκε χωρίς την επίδραση θέρμανσης, υπό ανάδευση για 15 ώρες.

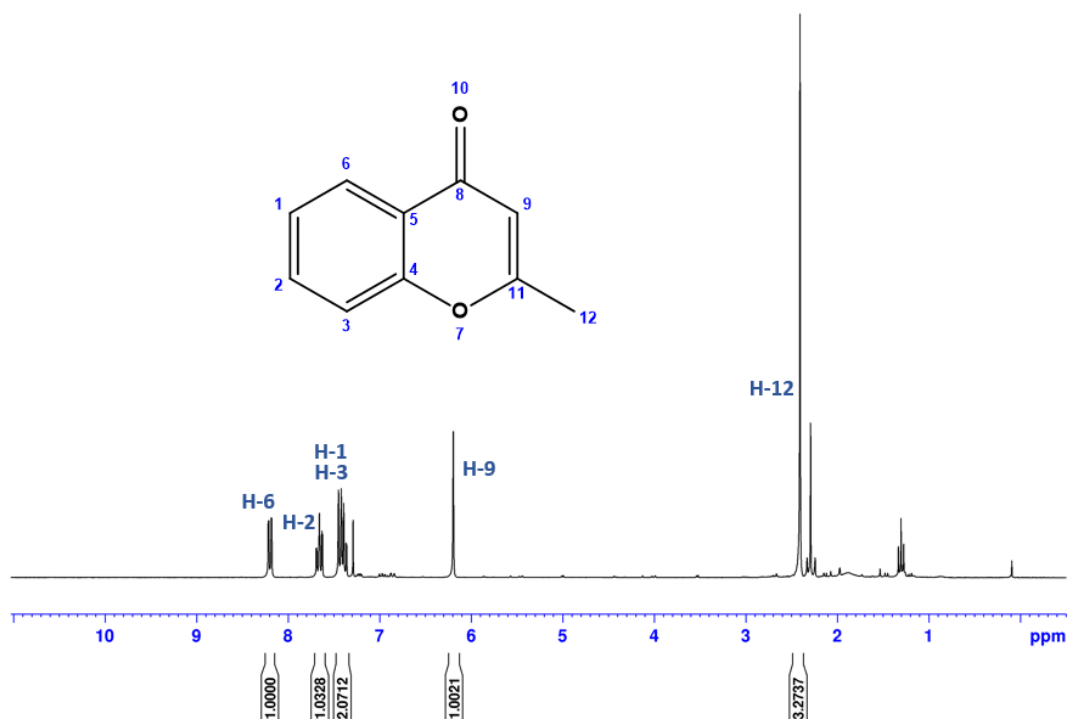
Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών 30% v/v οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο.

Ακολούθησε εξουδετέρωση του νατρίου και συμπύκνωση με εξάτμιση υπό υψηλό κενό. Έπειτα πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα/νερό (το προϊόν περνάει στην οργανική φάση). Οι οργανικές φάσεις ξηράνθηκαν με άνυδρο Na_2SO_4 , και συμπυκνώθηκαν με εξάτμιση υπό υψηλό κενό.

Το στερεό που λήφθηκε δε χρειάστηκε περαιτέρω καθαρισμό, οπότε χρησιμοποιήθηκε για την επόμενη αντίδραση: διαλύθηκε σε 25 ml μεθανόλης και ακολούθησε προσθήκη 3 ml πυκνού υδροχλωρικού οξέος. Η αντίδραση αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση για 15 ώρες.

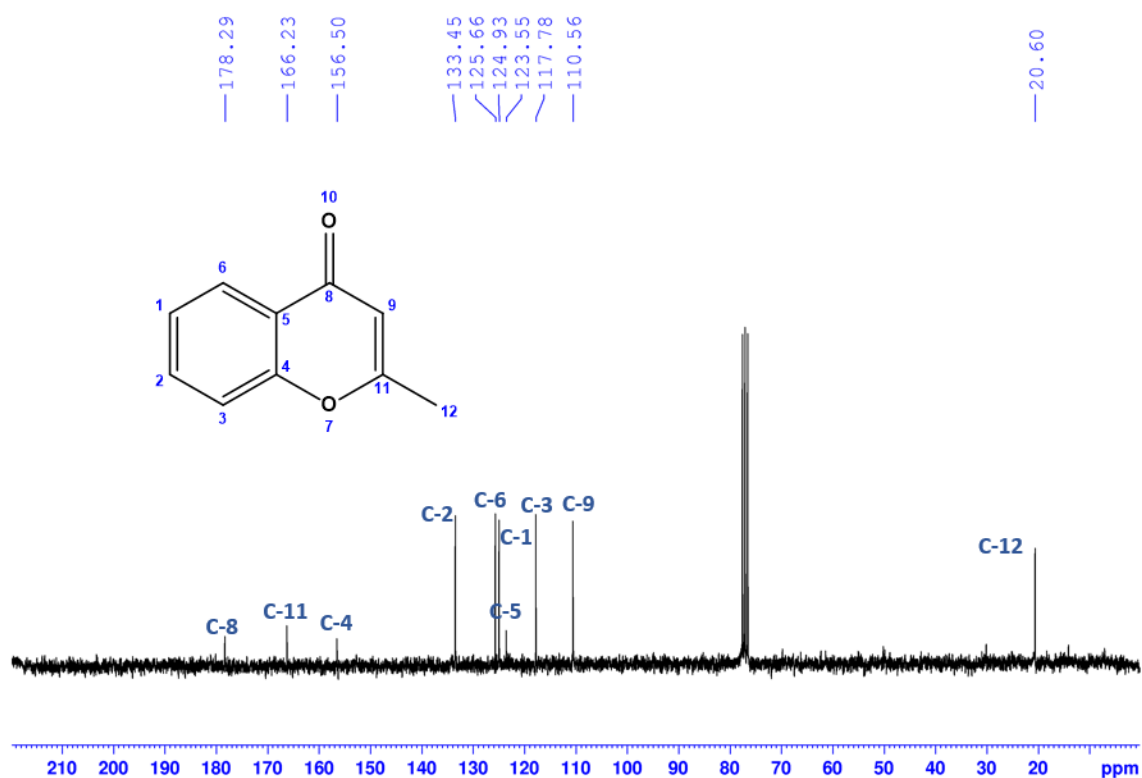
Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών 50% v/v οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο.

Ο καθαρισμός έγινε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα διαλυτών οξικό αιθυλεστέρα/εξάνιο. Έγινε σταδιακή άνοδος της πολικότητας μέχρι το 40%, όπου και κατέβηκε το προϊόν. Ακολούθησε συμπύκνωση με εξάτμιση υπό υψηλό κενό. Λήφθηκαν 140 mg προϊόντος με τη μορφή λευκού στερεού (απόδοση 60%).



Εικόνα 72. Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 11α σε CDCl_3 (400 MHz, 25 °C)

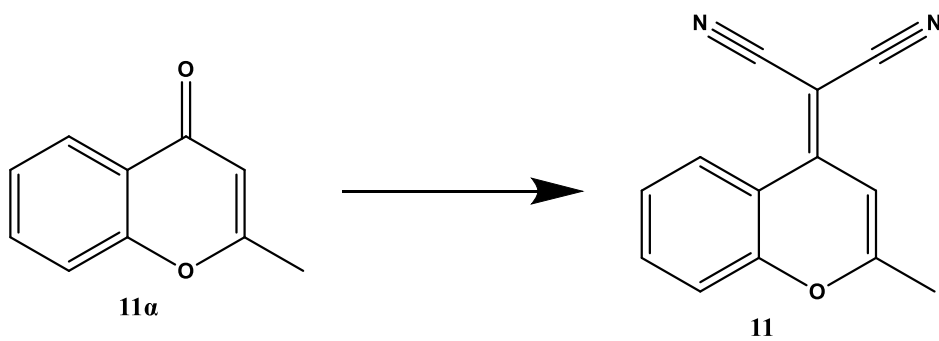
^1H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ : 8.24 (d, $J=8.78$ Hz, 1H, H-6), 7.73 (d, $J=7.91$, 1H, H-2), 7.50-7.45 (m, 2H, H-1, H-3), 6.20 (s, 1H, H-9), 2.41 (s, 3H, H-12)



Εικόνα 73. Φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης 11α σε DMSO-d_6 (400 MHz, 25 °C)

^{13}C NMR (63 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_6$) δ : 178.29 (C-8), 166.23 (C-11), 156.50 (C-4), 133.45 (C-2), 125.66 (C-6), 124.93 (C-1), 123.55 (C-5), 117.78 (C-3), 110.56 (C-9), 20.60 (C-12)

2.3.3 Σύνθεση της ένωσης 11



Εικόνα 74. Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 11

Πειραματική πορεία

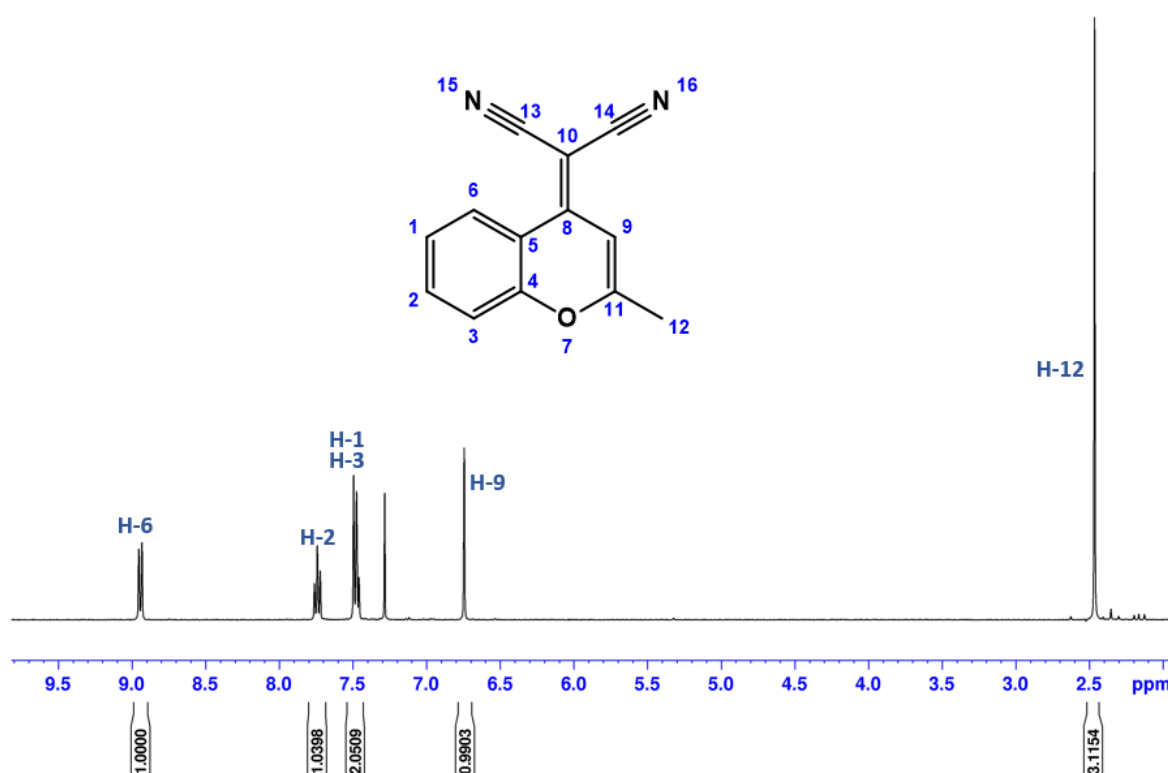
Για τη σύνθεση της ένωσης 11 έγινε αντίδραση συμπύκνωσης Knoevenagel και αντί κετόνης έχει ενσωματωθεί το δικυανομεθυλένιο.

Η ένωση 8α (140 mg, 0.87 mmol) μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη των 25ml και διαλύθηκε σε 3 ml οξικού ανυδρίτη. Ακολούθησε η προσθήκη του μαλονονιτριλίου (0.240 ml, 4 mmol) και η αντίδραση αφέθηκε υπό reflux και ανάδευση για 15 ώρες.

Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών 50% ν/ν οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο.

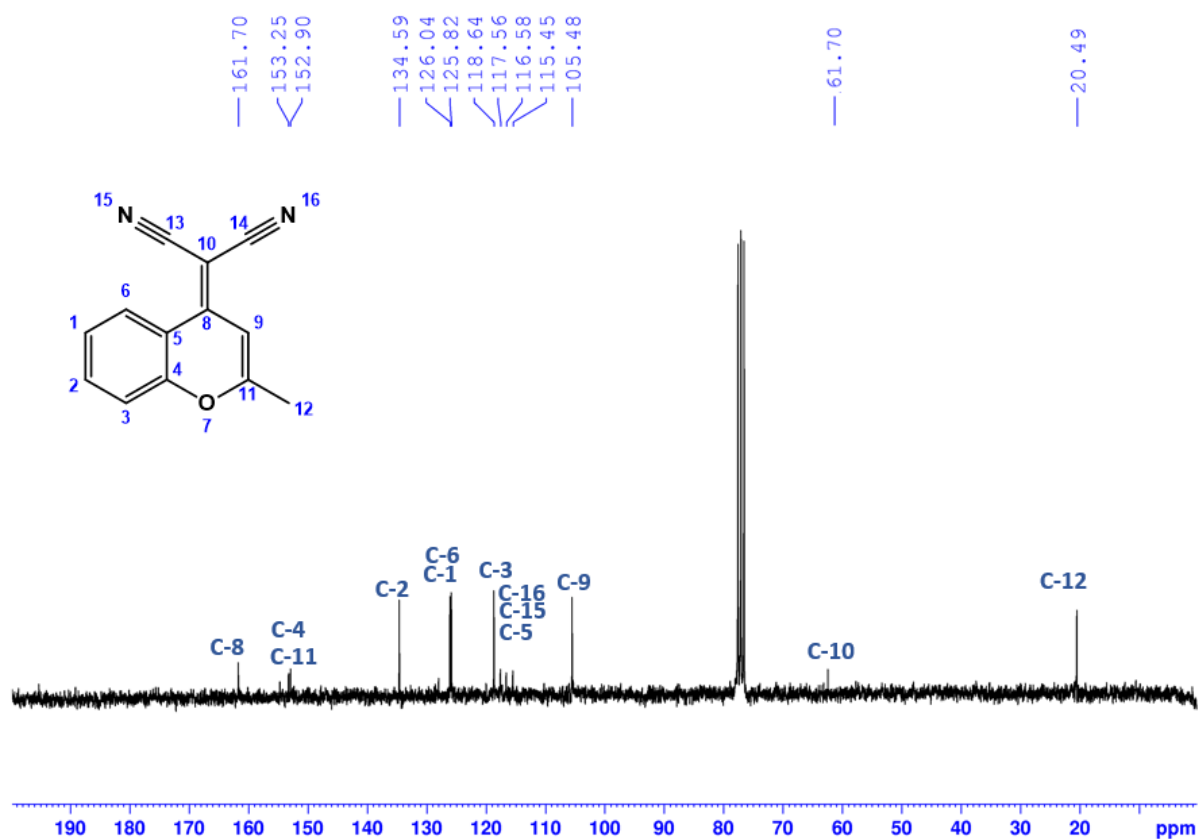
Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνθηκε με απόσταση υπό υψηλό κενό. Έπειτα πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα/νερό (το προϊόν περνάει στην οργανική φάση). Οι οργανικές φάσεις ξηράθηκαν με άνυδρο Na_2SO_4 , και συμπυκνώθηκαν με εξάτμιση υπό υψηλό κενό.

Ακολούθησε καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως σύστημα διαλυτών οξικό αιθυλεστέρα/εξάνιο. Έγινε σταδιακή αύξηση της πολικότητας στα ποσοστά 10, 20, 30, 40 και 50%, όπου και κατέβηκε το προϊόν. Λήφθηκαν 83 mg προϊόντος με τη μορφή κίτρινου στερεού (απόδοση 46%).



Εικόνα 75. Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 11 σε CDCl_3 (400 MHz, 25 °C)

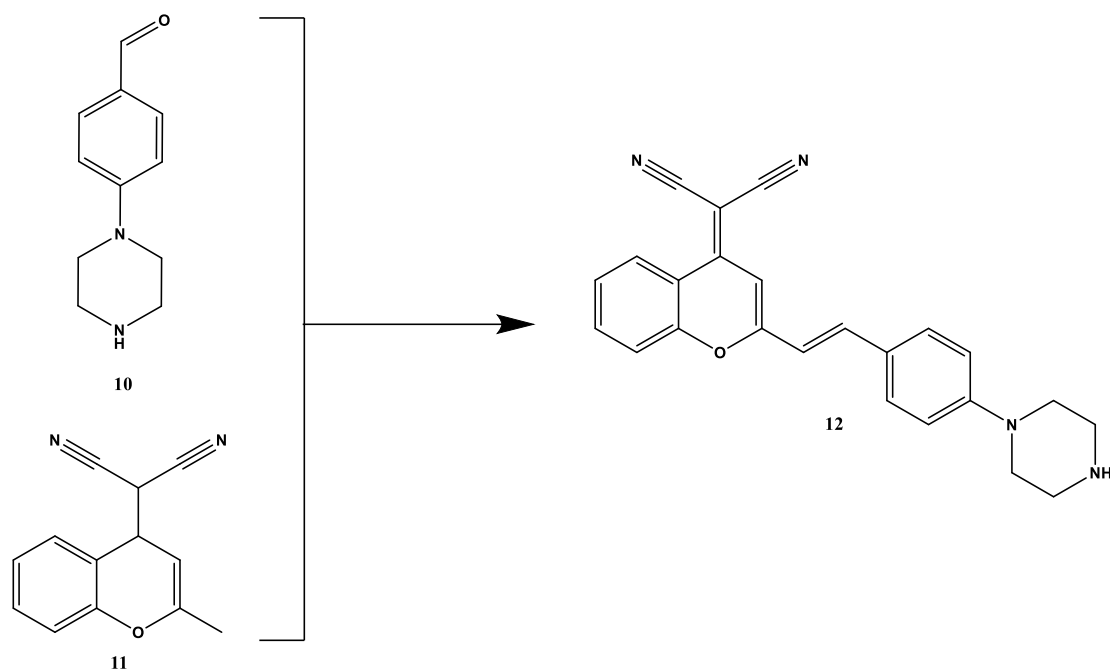
^1H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ : 8.94 (d, $J=8.78$ Hz, 1H, H-6), 7.73 (d, $J=7.91$, 1H, H-2), 7.50-7.45 (m, 2H, H-1, H-3), 6.74 (s, 1H, H-9), 2.49 (s, 3H, H-12)



Εικόνα 76. Φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης 11 σε DMSO-d_6 (400 MHz, 25 °C)

^{13}C NMR (63 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_6$) δ : 161.89 (C-8), 153.25 (C-11), 152.90 (C-4), 134.59 (C-2), 126.04 (C-6), 125.82 (C-1), 118.64 (C-3), 117.56 (C-16), 116.58 (C-15), 115.45 (C-5), 105.48 (C-9), 61.70 (C-10), 20.49 (C-12)

2.3.4 Σύνθεση της ένωσης 12



Εικόνα 77. Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 12

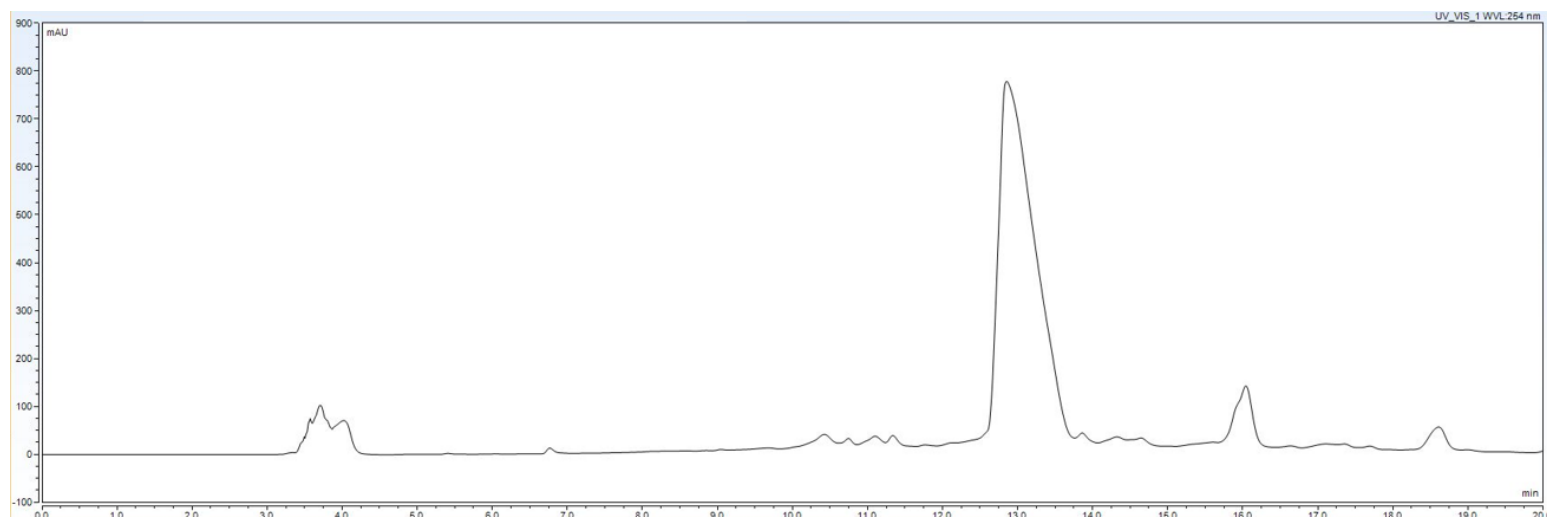
Πειραματική πορεία

Η αντίδραση για τον σχηματισμό της ένωσης 12 προχωρά μέσω μιας αντίδρασης συμπύκνωσης τύπου Knoevenagel μεταξύ της ένωσης 10 και της ένωσης 11.

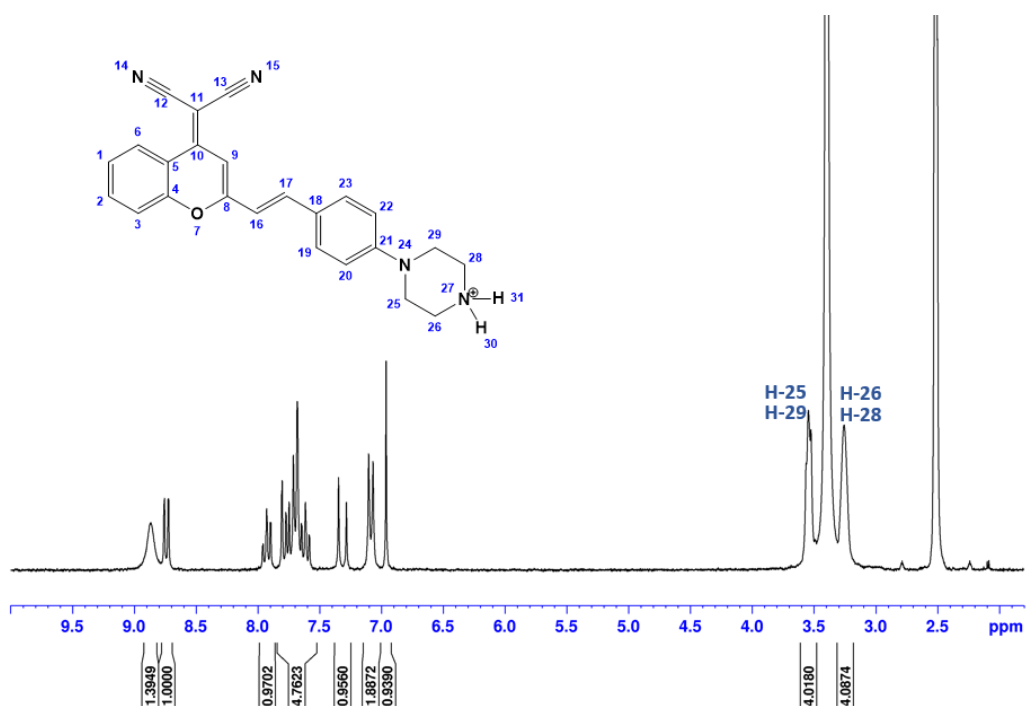
Η ένωση 11 (109 mg, 0.52 mmol) μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη των 10 ml και διαλύθηκε σε ακετονιτρίλιο. Ακολούθησε προσθήκη της ένωσης 10 (100 mg, 0.52 mmol) και πιπεριδίνης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση και θέρμανση σε επαναροή για 15 ώρες.

Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC σε διχλωρομεθάνιο, όπου και διαπιστώθηκε η ολοκλήρωσή της.

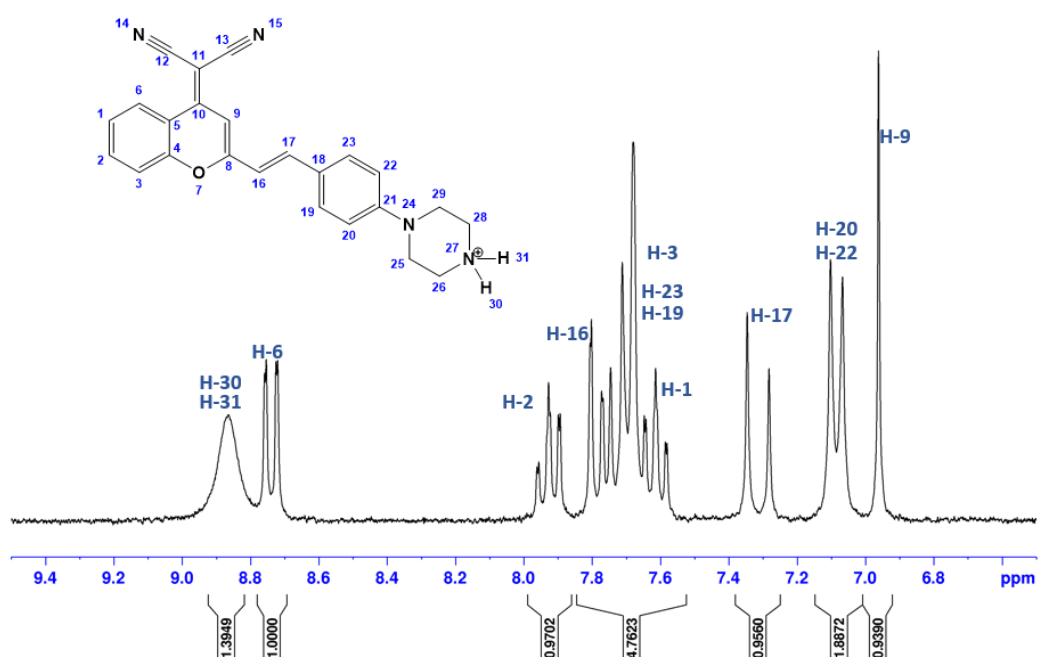
Ακολούθως ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα της αντίδρασης καθαρίστηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε σύστημα που διήρκεσε 20 λεπτά από 15% (ACN / H₂O) έως 95% (ACN / H₂O). Η λάμπα του UV ρυθμίστηκε στα 254 nm, η ροή στα 20 ml /min και το επιθυμητό προϊόν συλλέχθηκε στα 13 λεπτά. Το διάλυμα από την HPLC τοποθετήθηκε στην λυοφιλοποίηση για την απομάκρυνση του H₂O και η επιθυμητή ένωση απομονώθηκε ως κόκκινο στερεό με συνολική απόδοση 42% (84 mg).



Εικόνα 78. Χρωματογράφημα καθαρισμού της ένωσης 12 σε σύστημα που διήρκτησε 20 λεπτά από 15% (ACN / H₂O) έως 95% (ACN / H₂O)

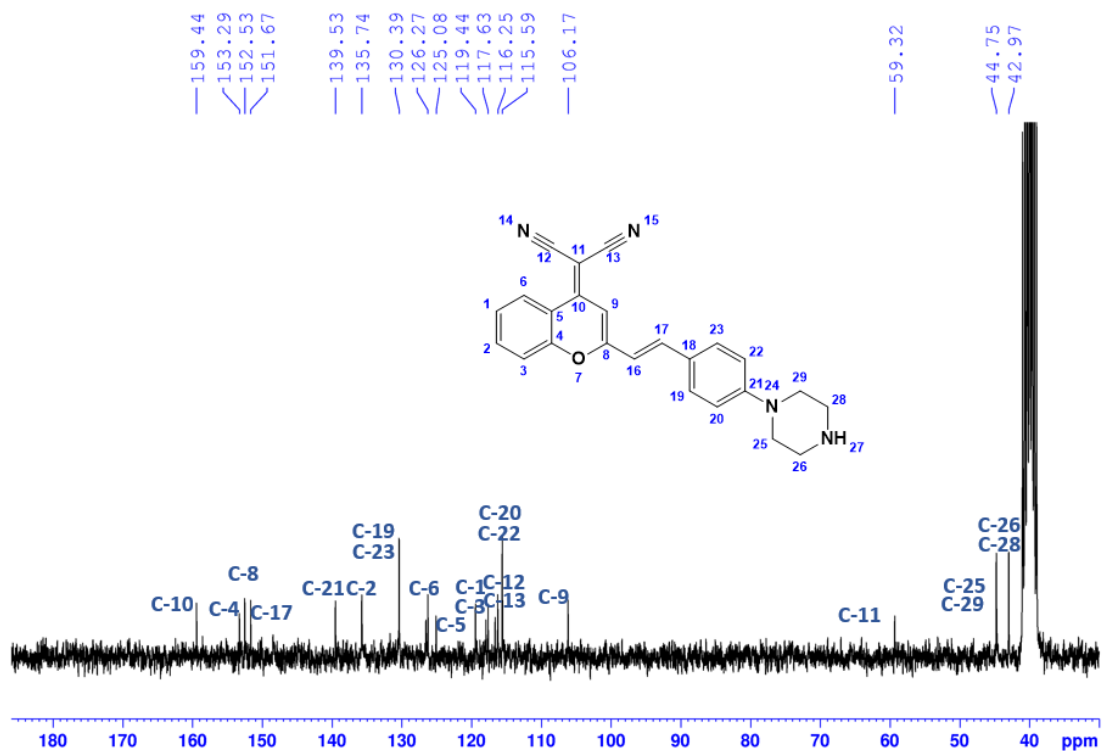


Εικόνα 79. Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης 12 σε DMSO-d₆ (400 MHz, 25 °C)



Εικόνα 80. Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 12 σε DMSO-d_6 (400 MHz, 25 °C) (εστίαση στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων)

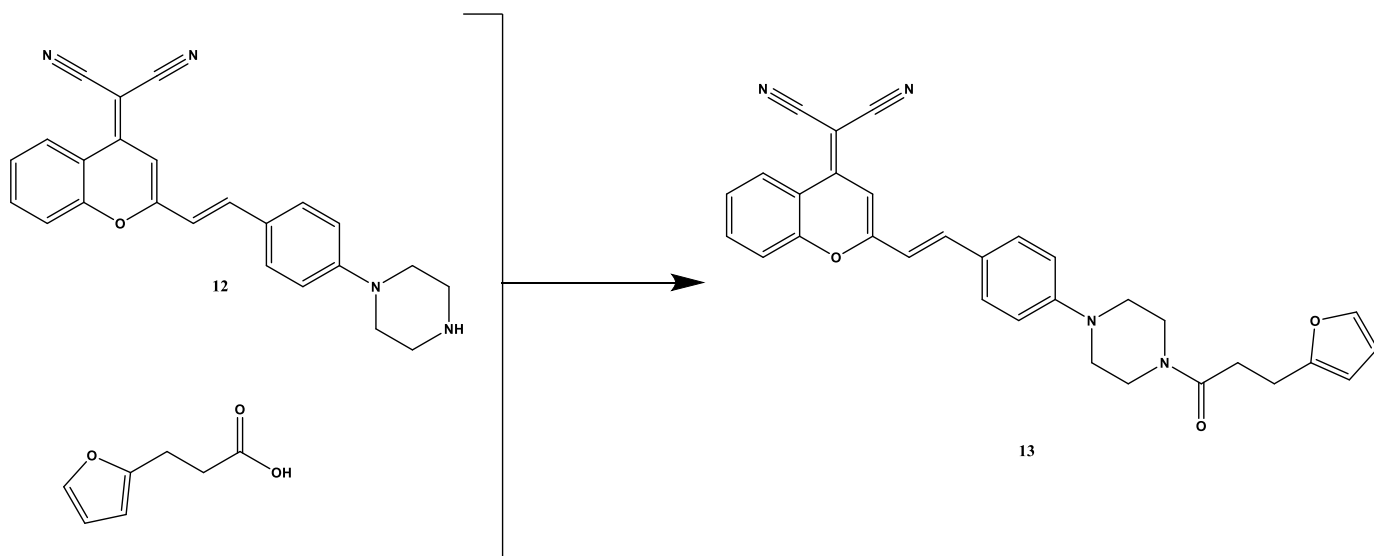
^1H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ : 8.86 (s, 2H, H-30, H-31), 8.73 (d, $J=8.52$ Hz, 1H, H-6), 7.92 (t, $J=8.10$ Hz, 1H, H-2), 7.58-7.81 (m, 5H, H-16, H-3, H-23, H-19, H-1), 7.31 (d, $J=16.44$ Hz, 1H, H-17), 7.08 (d, $J=8.95$ Hz, H-20, H-22), 6.96 (s, 1H, H-9), 3.54 (s, 4H, H-25, H-29), 3.25 (s, 4H, H-26, H-28)



Εικόνα 81. Φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης 12 σε $\text{DMSO}-d_6$ (400 MHz, 25 °C)

^{13}C NMR (63 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 159.44 (C-10), 153.29 (C-4), 152.53 (C-8), 151.67 (C-17), 139.53 (C-21), 135.74 (C-2), 130.39 (C-19, C-23), 126.27 (C-6), 125.08 (C-5), 119.44 (C-3), 117.63 (C-1), 116.25 (C-12, C-13), 115.59 (C-20, C-22), 106.17 (C-9), 59.32 (C-11), 44.75 (C-25, C-29), 42.97 (C-26, C-28)

2.3.5 Σύνθεση της ένωσης 13



Εικόνα 82. Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 13

Πειραματική πορεία

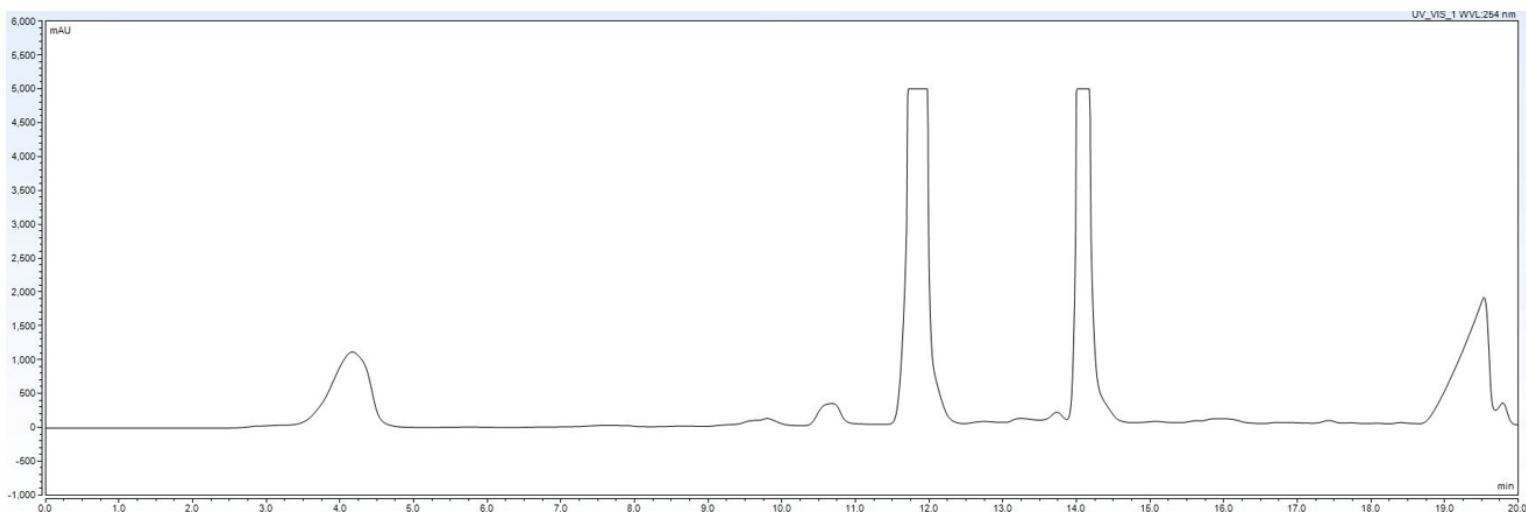
Για το σχηματισμό της ένωσης 13 έγινε αντίδραση σχηματισμού αμιδικού δεσμού ανάμεσα στην ένωση 9 και στο 2-φουρανπροπανοϊκό οξύ.

Αναλυτικότερα:

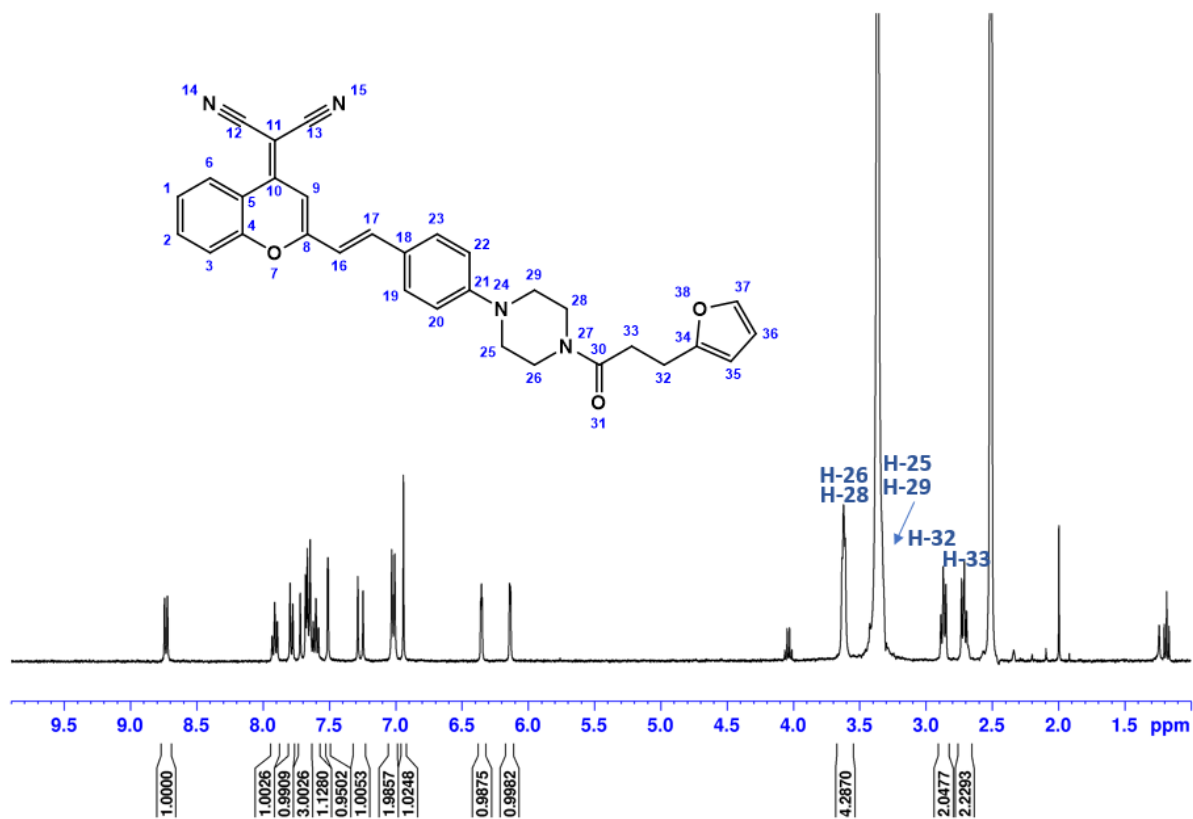
Σε σφαιρική των 10 ml μεταφέρθηκε το 2-φουρανπροπανοϊκό οξύ (11 mg, 0.079 mmol) και διαλύθηκε σε ακετονιτρίλιο. Έπειτα προστέθηκαν το N, N'-δισοπροπυλκαρβοδιιμίδιο (12 μ l, 0.079 mmol) και το υδροξυβενζοτρίαζόλιο (10.6 mg, 0.079 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά προκειμένου να ενεργοποιηθεί το καρβοξυλικό οξύ.

Ακολούθησε προσθήκη της ένωσης 12 (10 mg, 0.026 mmol). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες.

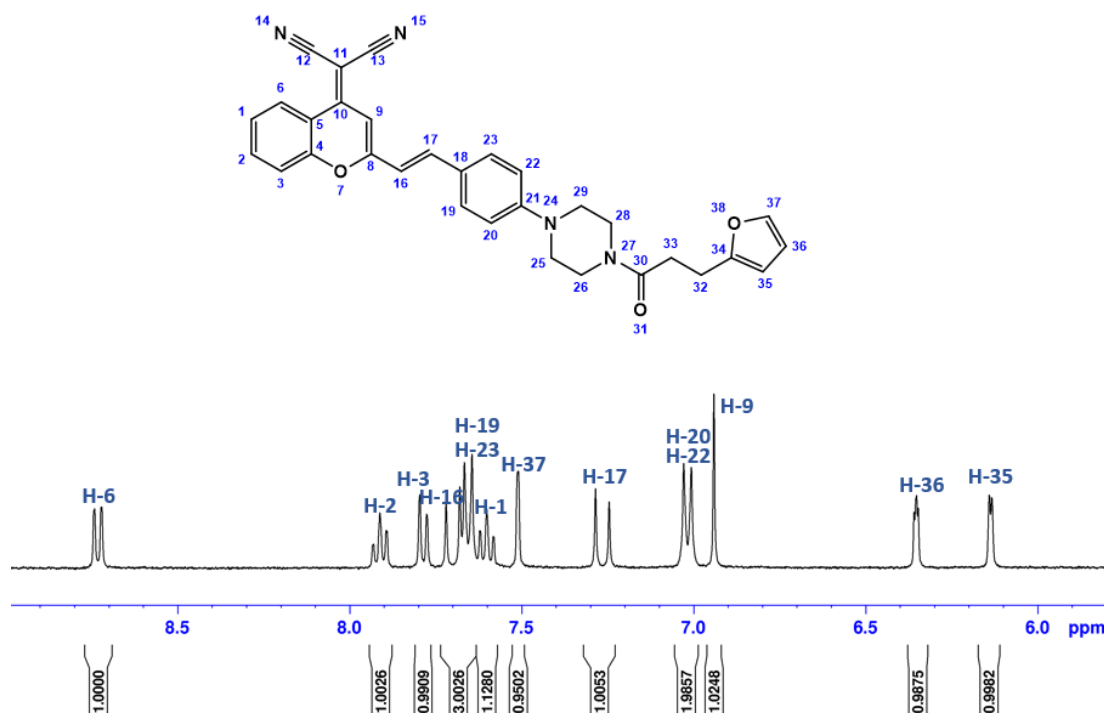
Ακολούθως ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα της αντίδρασης καθαρίστηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε σύστημα που διήρκεσε 20 λεπτά από 20% (ACN / H₂O) έως 95% (ACN / H₂O). Η λάμπα του UV ρυθμίστηκε στα 254 nm, η ροή στα 20 ml /min και το επιθυμητό προϊόν συλλέχθηκε στα 14 λεπτά. Το διάλυμα από την HPLC τοποθετήθηκε στην λυοφιλοποίηση για την απομάκρυνση του H₂O και η επιθυμητή ένωση απομονώθηκε ως σκούρο κόκκινο στερεό με συνολική απόδοση 50% (7 mg).



Εικόνα 83. Χρωματογράφημα καθαρισμού της ένωσης 13 σε σύστημα που διήρκεσε 20 λεπτά από 20% (ACN / H₂O) έως 95% (ACN / H₂O)

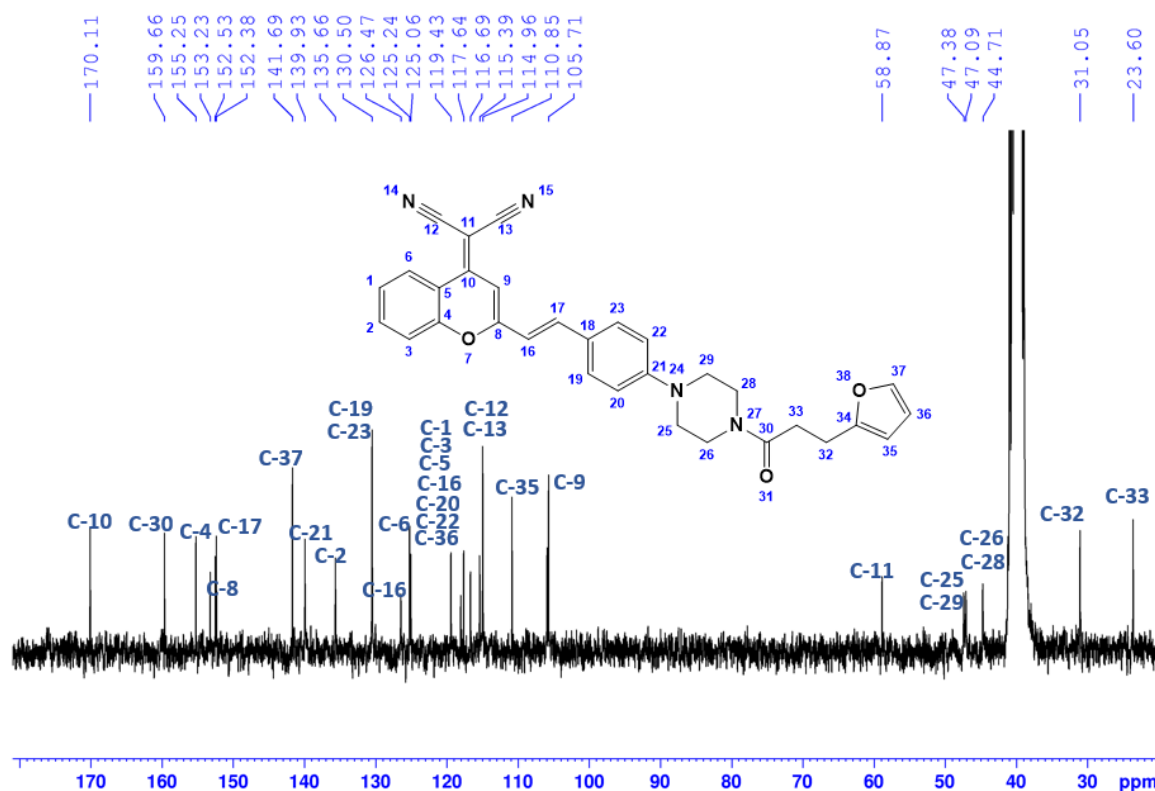


Εικόνα 84. Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 13 σε $\text{DMSO}-d_6$ (400 MHz, 25 $^\circ\text{C}$)



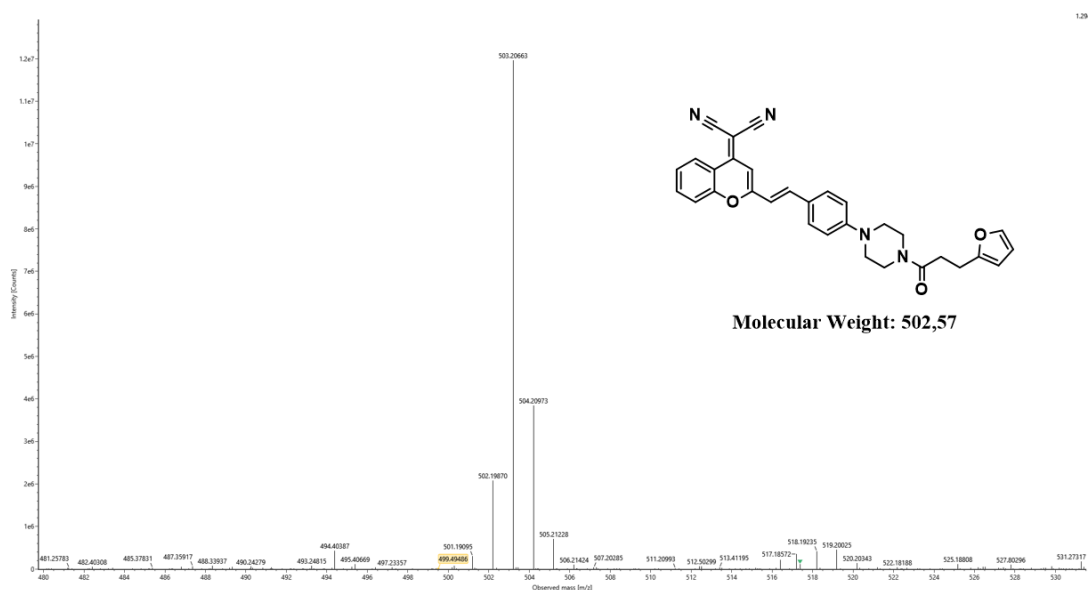
Εικόνα 85. Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 13 σε DMSO-d_6 (400 MHz, 25 °C) (εστίαση στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων)

^1H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ : 8.73 (d, $J=8.32$ Hz, 1H, H-6), 7.92 (t, $J=8.10$ Hz, 1H, H-2), 7.78 (d, $J=8.40$ Hz, 1H, H-3), 7.63-7.80 (m, 3H, H-16, H-19, H-23) 7.60 (t, $J=8.10$ Hz, 1H, H-1), 7.51 (s, 1H, H-37), 7.26 (d, $J=16.26$ Hz, 1H, H-17), 7.08 (d, $J=8.95$ Hz, 2H, H-20, H-22), 6.96 (s, 1H, H-9), 6.35 (s, 1H, H-36), 6.13 (s, 1H, H-35), 3.62 (s, 4H, H-26, H-28), 3.35-3.33 (s, 4H, H-25, H-29), 2.86 (t, $J=7.90$ Hz, 2H, H-32), 2.70 (t, $J=7.90$ Hz, 2H, H-33)



Εικόνα 86. Φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης 13 σε $\text{DMSO}-d_6$ (400 MHz, 25 °C)

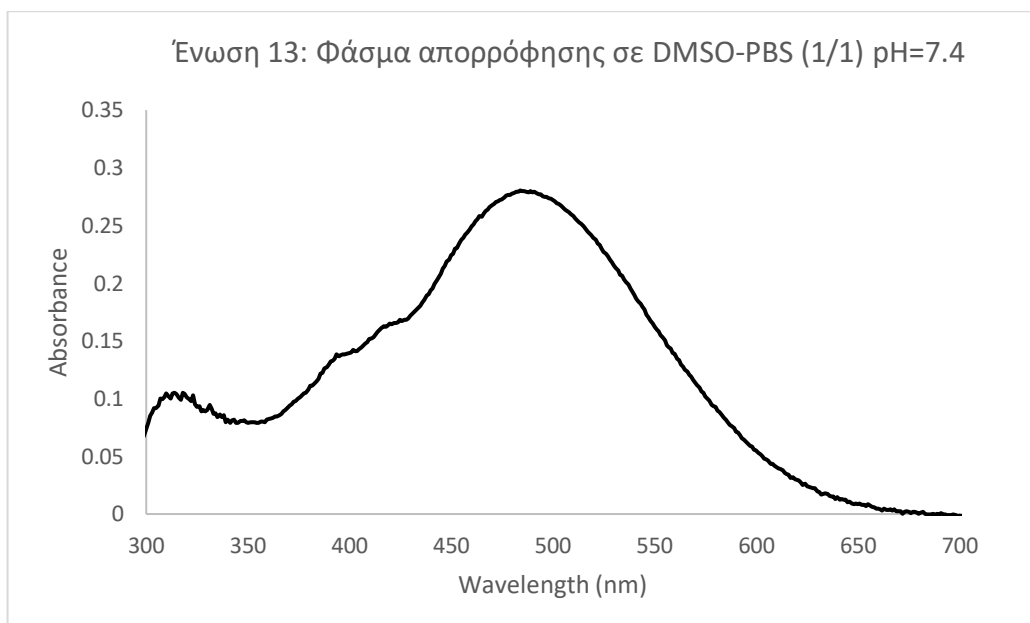
^{13}C NMR (63 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 170.11 (C-10), 159.66 (C-30), 155.25 (C-4), 153.23 (C-8), 152.53 (C-17), 152.38 (C-37), 141.69 (C-21), 139.93 (C-2), 135.66 (C-19, C-23), 130.50 (C-16), 126.47 (C-6), 125.24 (C-1), 125.06 (C-3), 119.43 (C-5), 117.64 (C-16), 116.69 (C-20, C-22), 115.39 (C-36), 114.96 (C-12, C-13), 110.85 (C-35), 105.71 (C-9), 58.87 (C-11), 47.38, 47.09 (C-25, C-29), 44.71 (C-26, C-28), 31.05 (C-32), 23.60 (C-33)



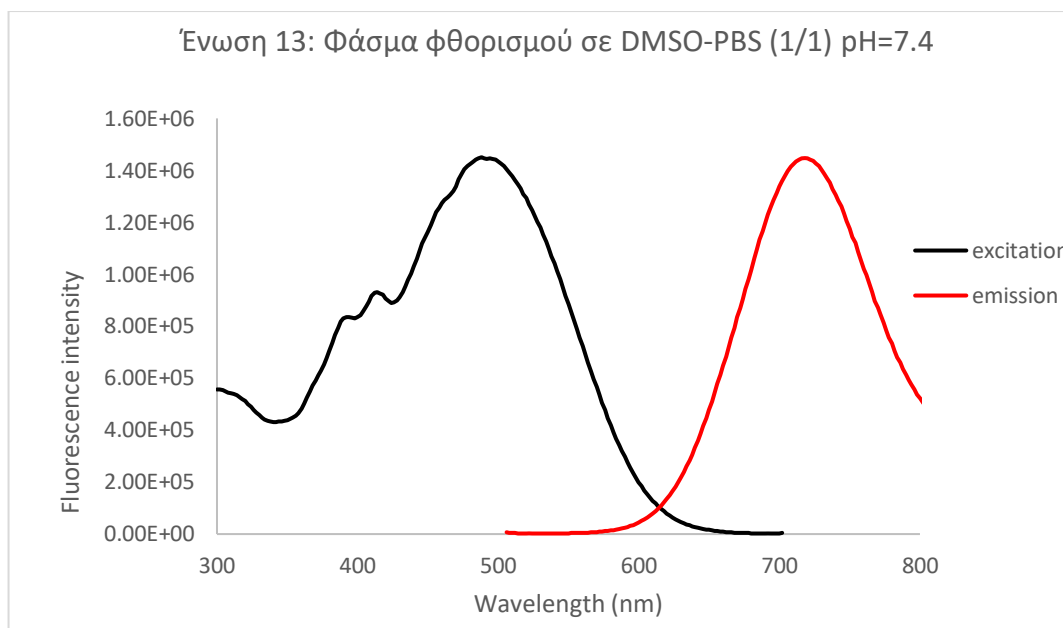
Εικόνα 87. Φάσμα μάζης υψηλής ανάλυσης της ένωσης 13. Το m/z 502.20 αντιστοιχεί στο $[\text{M}+\text{H}]^+$

2.3.6 Φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης 13

Προκειμένου να αξιολογήσουμε τις φασματικές ιδιότητες της ένωσης **13**, 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), σε pH 7.4, για να μελετήσουμε τις φασματικές 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 382 nm. Επίσης, μελετήθηκαν τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής με λ_{exc} 470 nm και λ_{em} 688 nm. Τέλος, υπολογίστηκε η μετατόπιση Stokes ίση με 218 nm και για αυτό υποθέτουμε ότι ακολουθείται ο μηχανισμός ICT που περιγράφηκε παραπάνω.



Εικόνα 88. Φάσμα απορρόφησης σε DMSO-PBS (1/1) pH=7.4 της ένωσης 13 (25°C)



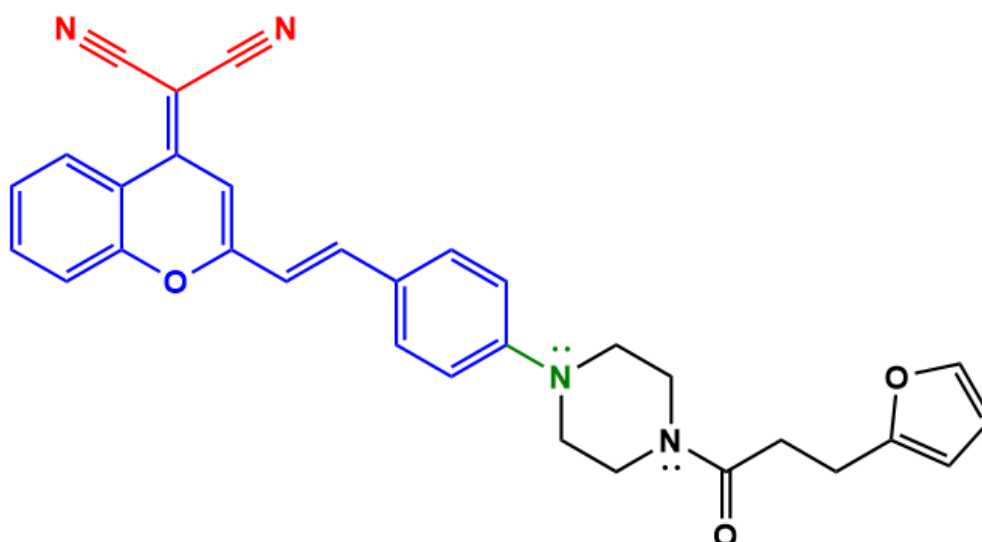
Εικόνα 89. Φάσμα φθορισμού σε DMSO-PBS (1/1) pH=7.4 της ένωσης 13 (10μM) (25°C). Με μαύρο χρώμα απεικονίζεται το φάσμα διέγερσης και με κόκκινο το φάσμα εκπομπής

Πίνακας 1. Μήκη κύματος απορρόφησης, διέγερσης, εκπομπής και μετατόπιση Stokes της ένωσης 13

λ_{abs} (nm)	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emission}}$ (nm)	Stokes shift (nm)
492	478	722	244

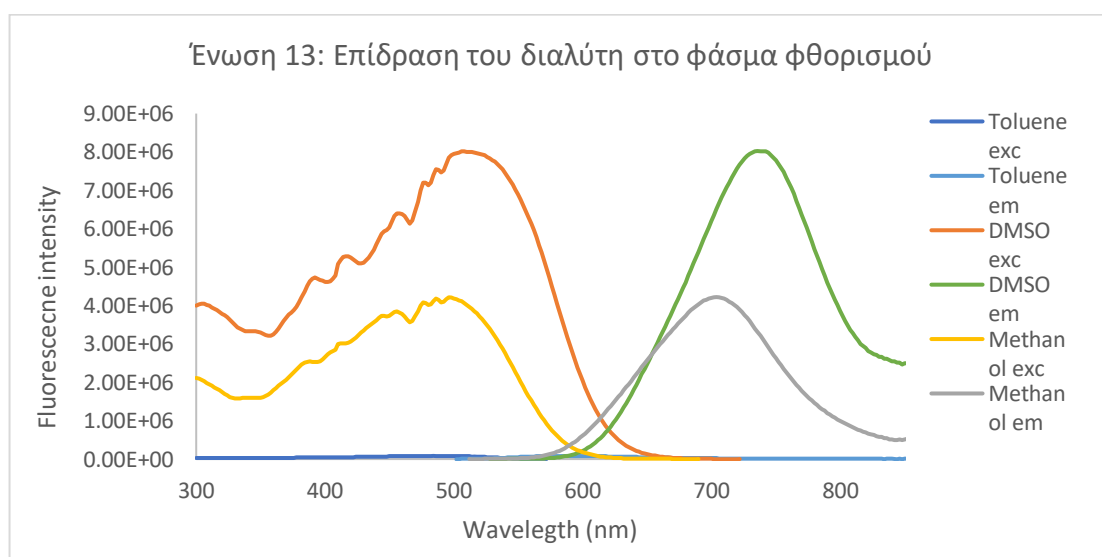
2.3.6.1 Επίδραση του διαλύτη

Και η συγκεκριμένη ένωση παρουσιάζει ομάδες δότη και δέκτη, είναι δηλαδή, φθοροφόρο push-pull (ώθησης - έλξης) (**Εικόνα 90**). Για αυτό, λοιπόν, μελετήθηκε η επίδραση του διαλύτη στο φάσμα φθορισμού.



Εικόνα 90. Η δομή της ένωσης 13 όπου επισημαίνονται με πράσινο χρώμα οι δότες ηλεκτρονίων, με κόκκινο χρώμα οι δέκτες ηλεκτρονίων και με μπλε χρώμα ο συνδέτης

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα της ένωσης **13** (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).



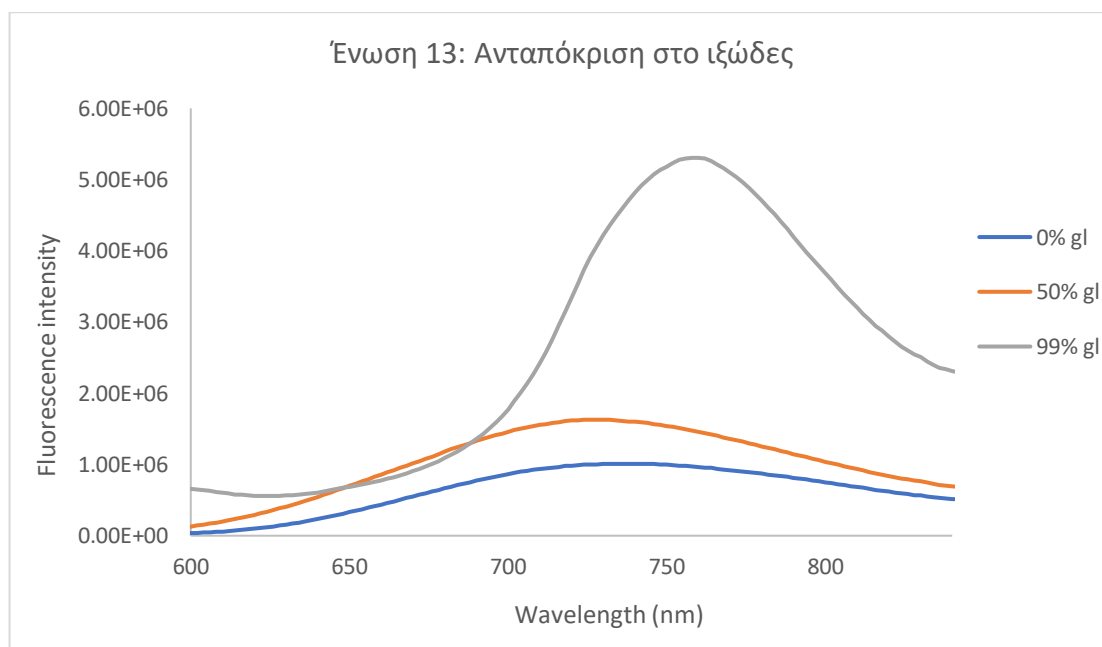
Εικόνα 91. Φάσματα εκπομπής και διέγερσης της ένωσης 13 (10 μ M) σε διάφορους διαλύτες (τολουόλιο, μεθανόλη, N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο) (25°C)

Πίνακας 2. Μήκη κύματος απορρόφησης και εκπομπής της ένωσης 13 συναρτήσει του διαλύτη

Διαλύτης	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)
Τολουόλιο (toluene) Μη πολικός διαλύτης	462	590
Διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide) Πολικός απρωτικός διαλύτης	510	746
Μεθανόλη (methanol) Πολικός πρωτικός διαλύτης	492	710

2.3.6.2 Ανταπόκριση στο ιώδες

Στη συνέχεια έγινε έλεγχος ανταπόκρισης της ένωσης **13** στη μεταβολή του ιώδους.

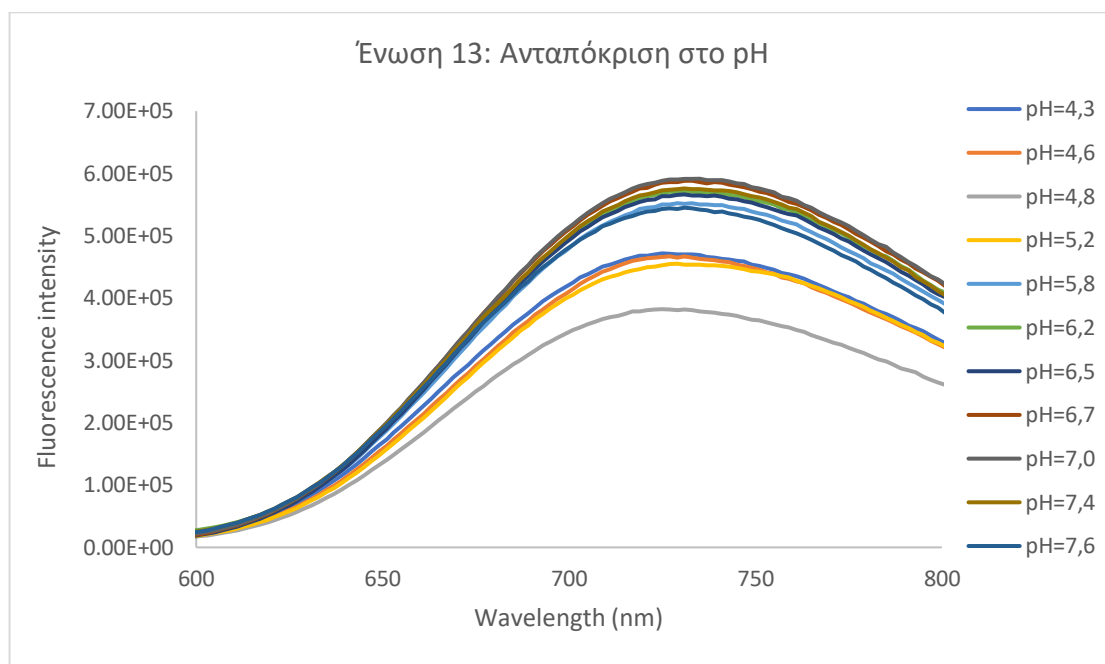


Εικόνα 92. Φάσματα φθορισμού της ένωσης 13 (10 μ M) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης-νερού (0%, 50% και 99% γλυκερόλη) κατόπιν διέγερσης στα 520 nm (25°C)

Όπως βλέπουμε στην **Εικόνα 92**, με την αύξηση του ιώδους παρατηρείται αύξηση στην ένταση του φθορισμού, χωρίς όμως κάποια σημαντική και απότομη μεταβολή.

2.3.6.3 Ανταπόκριση στο pH

Ακολούθησαν πειράματα σε διαφορετικά pH, για να μελετήσουμε την συμπεριφορά της ένωσης. Οι μετρήσεις έγιναν σε διαλύματα DMSO-PBS (1/3) στους 25°C με τελική συγκέντρωση της ένωσης στα 10μM.

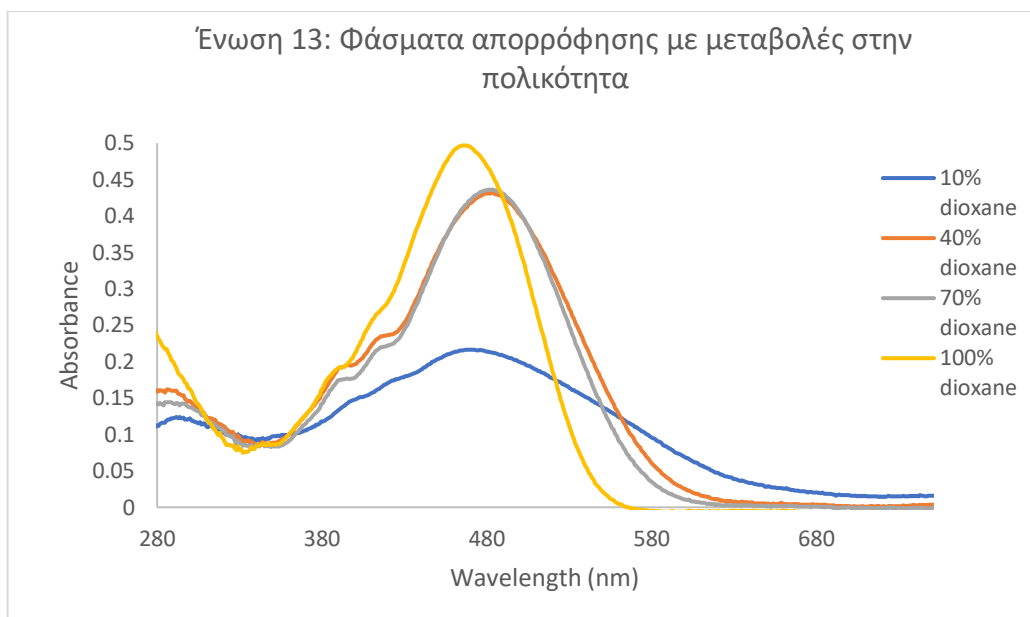


Εικόνα 93. Φάσματα φθορισμού της ένωσης 13 (10μM) σε διαφορετικά επίπεδα pH κατόπιν διέγερσης στα 450 nm (25°C)

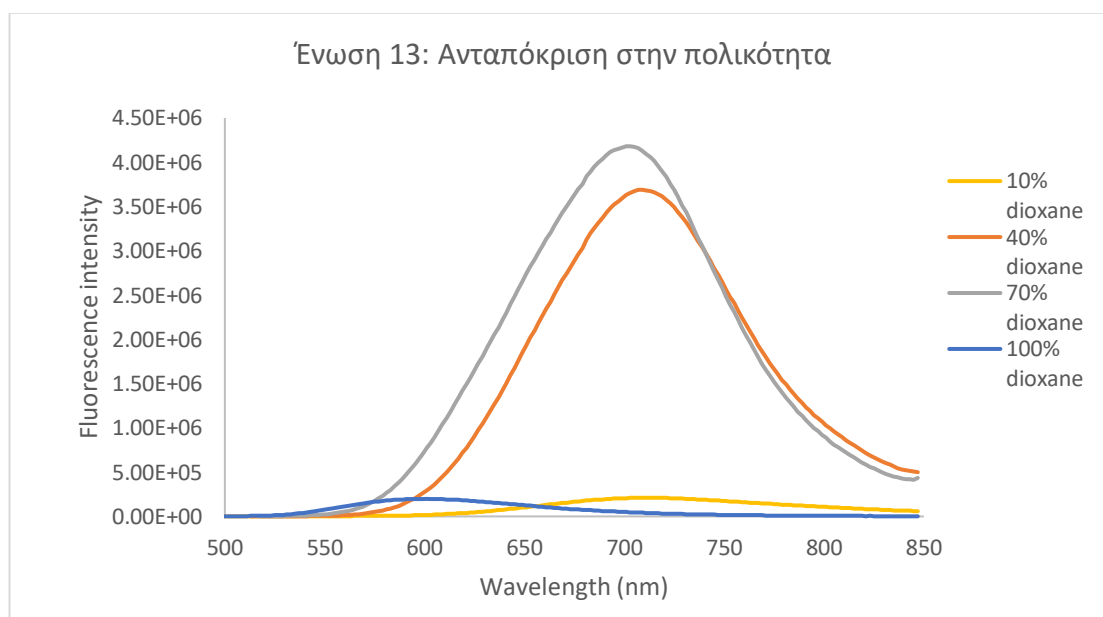
Από τα αποτελέσματα παρατηρούμε αύξηση της έντασης φθορισμού όσο μειώνεται το pH, αλλά χωρίς κάποια σημαντική μεταβολή με αποτέλεσμα η ένωση να μη μπορεί να λειτουργήσει ως «μάρτυρας» για μεταβολές του pH.

2.3.6.4 Ανταπόκριση στην πολικότητα

Ερευνήσαμε την ικανότητα της ένωσης **13** στο να ανιχνεύει αλλαγές στην πολικότητα. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού σε κάποια ενδεικτικά δυαδικά συστήματα 1,4-διοξανίου-νερού (10%, 40%, 70%, 100% διοξάνιο), όπου η διηλεκτρική σταθερά (ϵ) ελαττώνεται. Στις **εικόνες 94** και **95** απεικονίζονται τα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού της ένωσης **13** στα διάφορα διαλύματα 1,4-διοξανίου-νερού.



Εικόνα 94. Φάσματα απορρόφησης της ένωσης 13 (10 μ M) σε διάφορα συστήματα 1,4-διοξανίου-νερού (25°C)

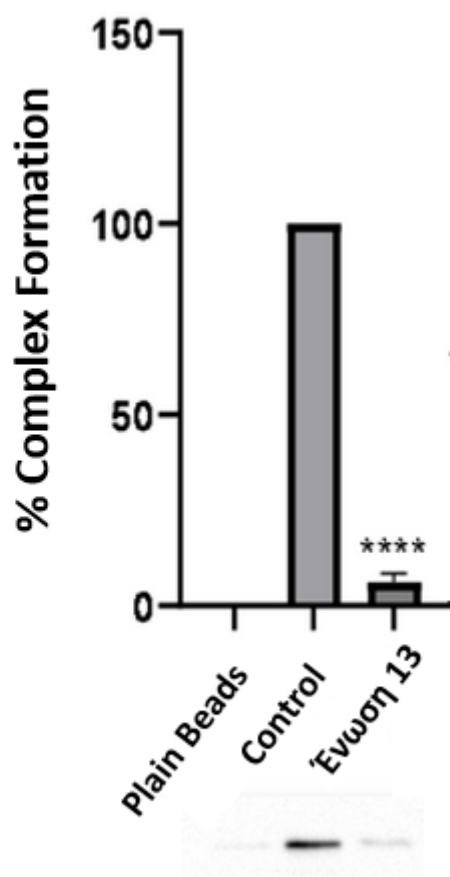


Εικόνα 95. Φάσματα φθορισμού της ένωσης 13 (10 μ M) σε διάφορα συστήματα 1,4-διοξανίου-νερού (25°C)

Όπως βλέπουμε και στην **εικόνα 95**, με την μείωση της πολικότητας του συστήματος (10% διοξάνιο μέχρι 70% διοξάνιο), ο φθορισμός της ένωσης αυξάνεται κατά **22 φορές** και σε 100% διοξάνιο παρατηρούμε την απόσβεση του φθορισμού, όπως έγινε προηγουμένως και στο τολουόλιο (αυτό συμβαίνει, δηλαδή, στους άπολους διαλύτες όπως το τολουόλιο και το 1,4-διοξάνιο).

2.3.7 Αξιολόγηση της ένωσης 13 ως προς την ικανότητα αναστολής σχηματισμού του συμπλόκου Mgc-Max

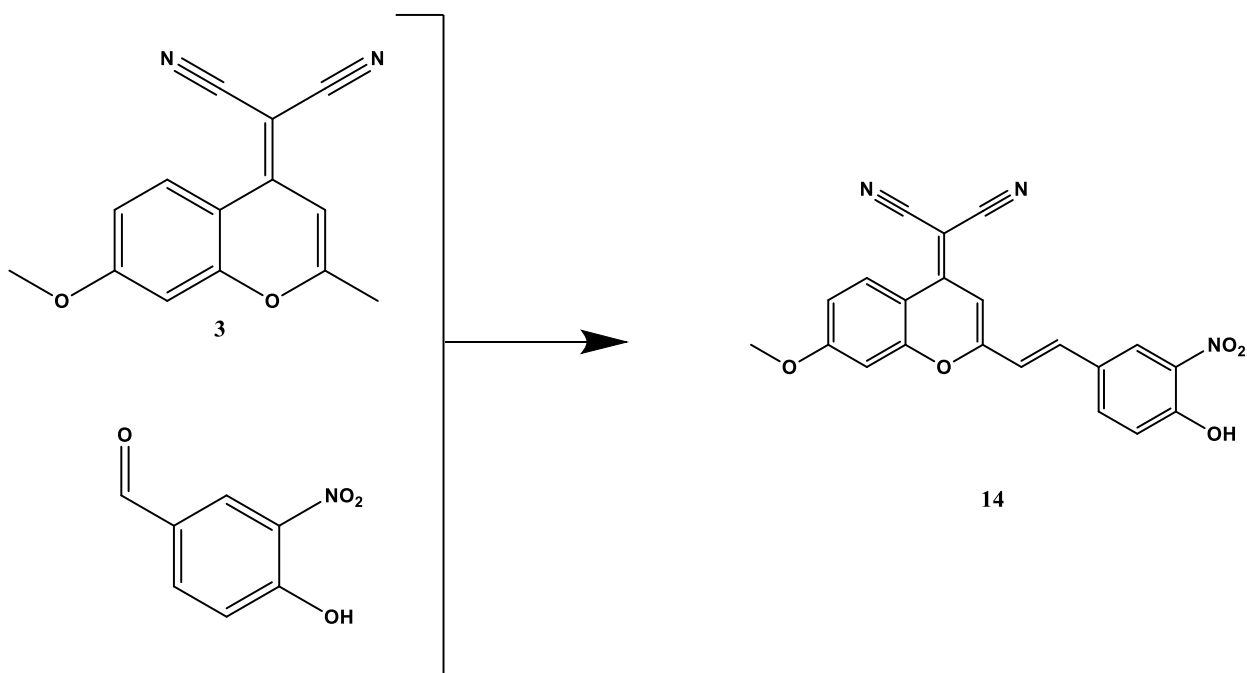
Ακολούθησε αξιολόγηση της ένωσης **13** ως προς την αναστολή σχηματισμού του συμπλόκου Myc-Max, με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Στην **Εικόνα 96** παρατηρείται ότι για την ένωση **13** εμφανίζεται πολύ μικρή ένταση στο σήμα της ανοσοαποτύπωση γεγονός που αποδεικνύει ότι προσδένεται πολύ ισχυρά με την πρωτεΐνη Myc αποτρέποντας τον σχηματισμό του συμπλόκου με την Max.



Εικόνα 96. Ποσοστό σχηματισμού του συμπλόκου με κενά σφαιρίδια γλουταθειόνης, χωρίς προεπάση με την ένωση 13, έπειτα από προεπάση με την ένωση 13 καθώς και η ανοσοαποτύπωση με χρήση αντισώματος έναντι της Max

2.4 Σύνθεση και αξιολόγηση πιθανού αναστολέα του σχηματισμού του συμπλόκου Myc-Max (ένωση 14)

2.4.1 Σύνθεση της ένωσης 14

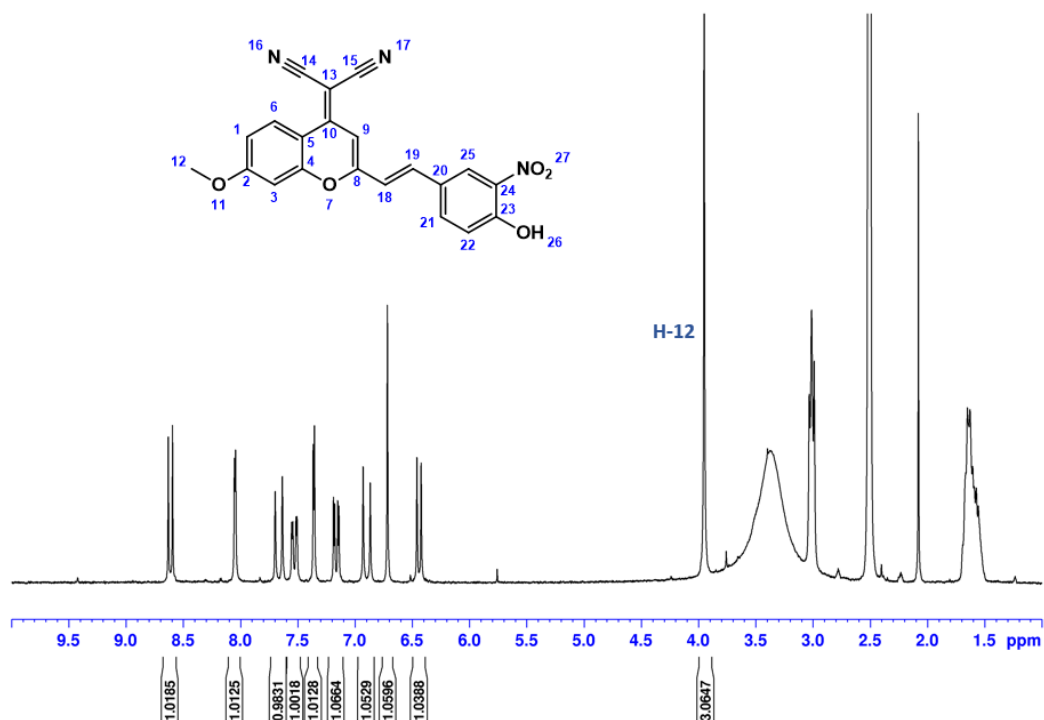


Εικόνα 97. Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 14

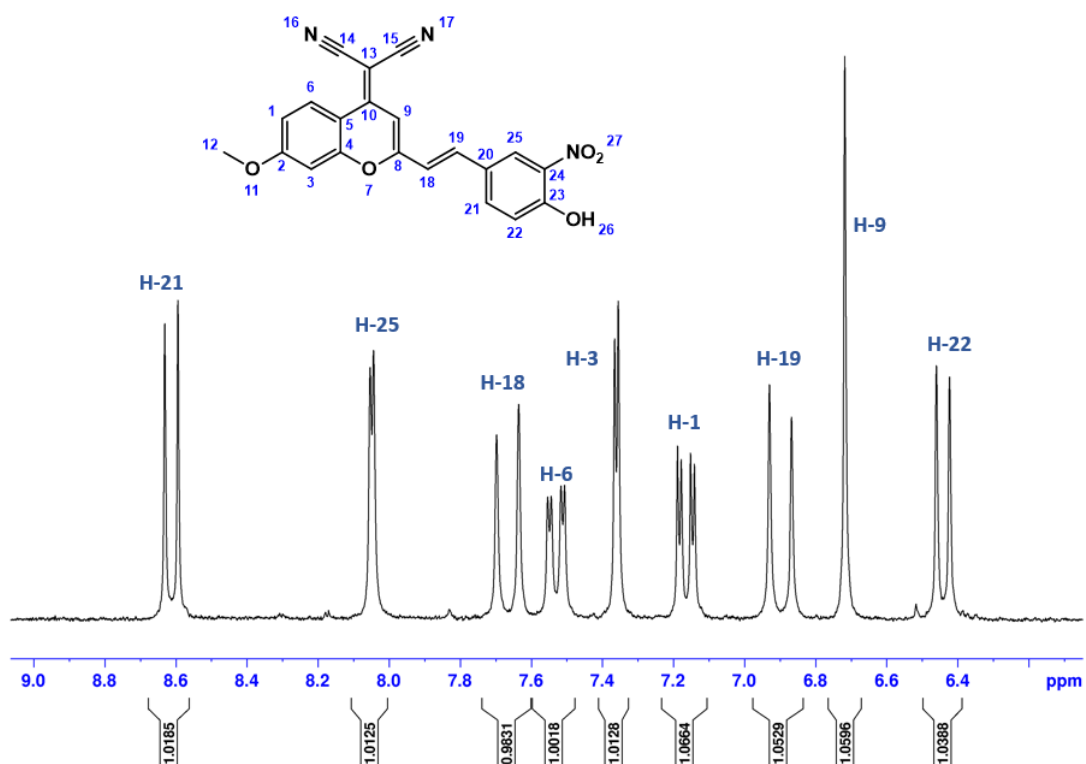
Πειραματική πορεία

Η ένωση 3 (60 mg, 0.25 mmol) μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη των 10 ml και διαλύθηκε σε ακετονιτρίλιο. Ακολούθησε προσθήκη της 3-νιτρο-4-υδροξυ-βενζαλδεΐδης (42 mg, 0.25 mmol) και σταγόνων πιπεριδίνης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση και θέρμανση σε επαναρροή για 16 ώρες.

Μετά από 16 ώρες είχε σχηματιστεί κόκκινο στερεό, το οποίο απομονώθηκε με φυγοκέντρωση και ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC.

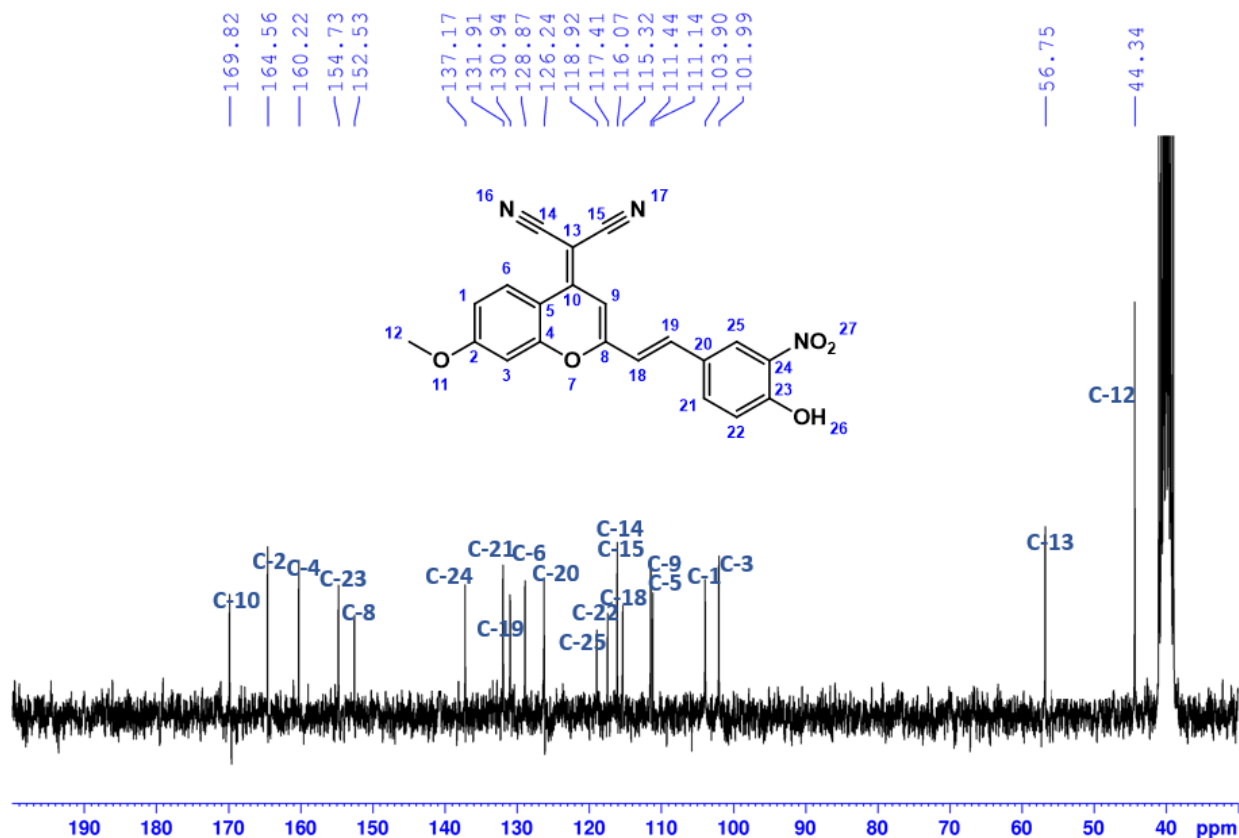


Εικόνα 98. Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 14 σε DMSO-d_6 (400 MHz, 25 °C)



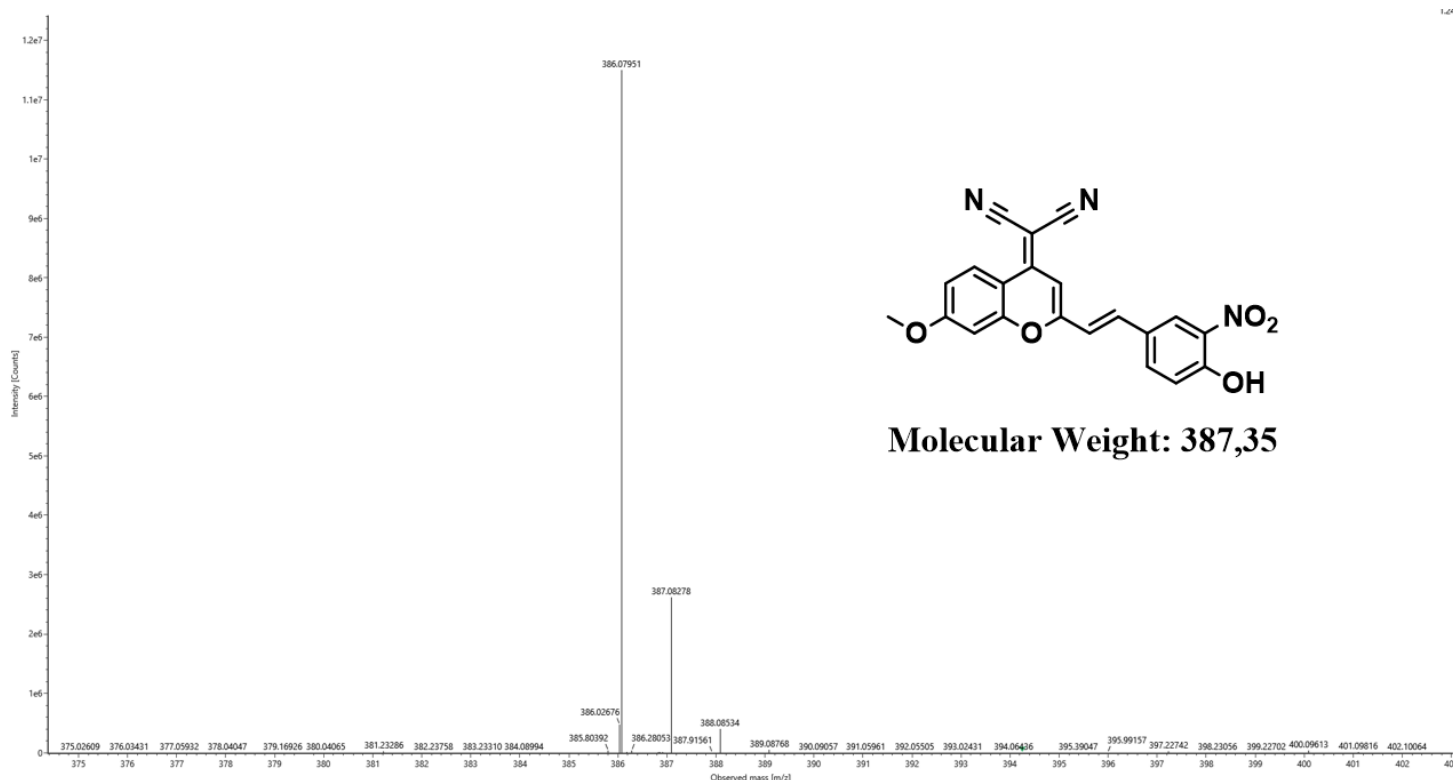
Εικόνα 99. Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 14 σε DMSO-d_6 (400 MHz, 25 °C) (εστίαση στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων)

^1H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ : 8.61 (d, $J=9.20$ Hz, 1H, H-21), 8.04 (s, 1H, H-25), 7.67 (d, $J=16.40$ Hz, 1H, H-18), 7.53 (d, $J=9.53$ Hz, 1H, H-6), 7.36 (s, 1H, H-3), 7.16 (d, $J=9.53$ Hz, 1H, H-1), 6.90 (d, $J=16.40$ Hz, 1H, H-19), 6.72 (s, 1H, H-9), 6.45 (d, $J=9.20$ Hz, 1H, H-22),



Εικόνα 100. Φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης 14 σε DMSO-d_6 (400 MHz, 25 °C)

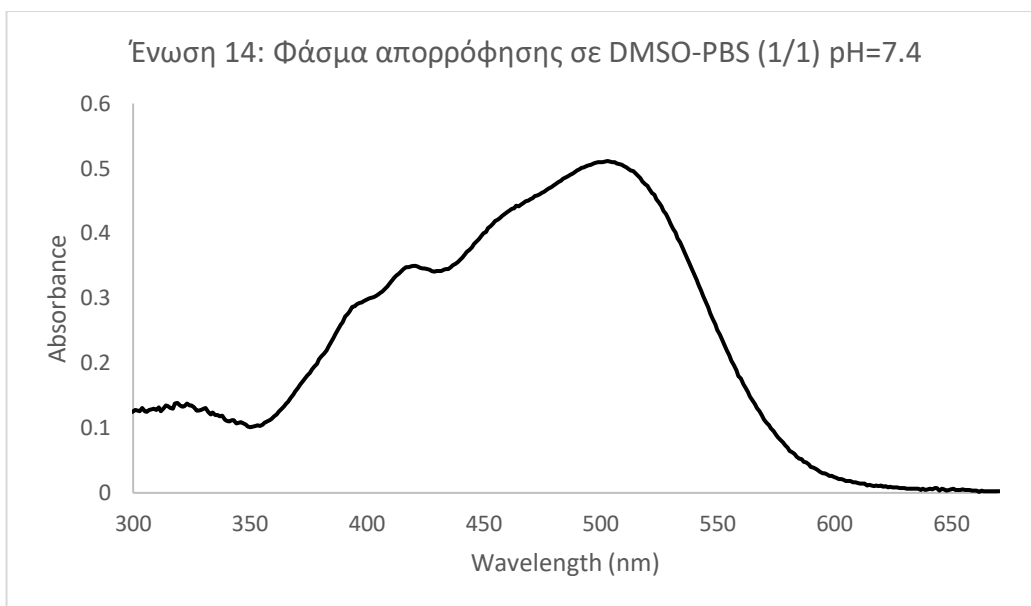
^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ : 169.82 (C-10), 164.56 (C-2), 160.22 (C-4), 154.73 (C-23), 152.53 (C-8), 137.17 (C-24), 131.91 (C-21), 130.94 (C-19), 128.87 (C-6), 126.24 (C-20), 118.92 (C-25), 117.41 (C-22), 116.07 (C-14, C-15), 115.32 (C-18), 111.44 (C-5), 111.14 (C-9), 103.90 (C-1), 101.99 (C-3), 56.75 (C-13), 44.34 (C-12)



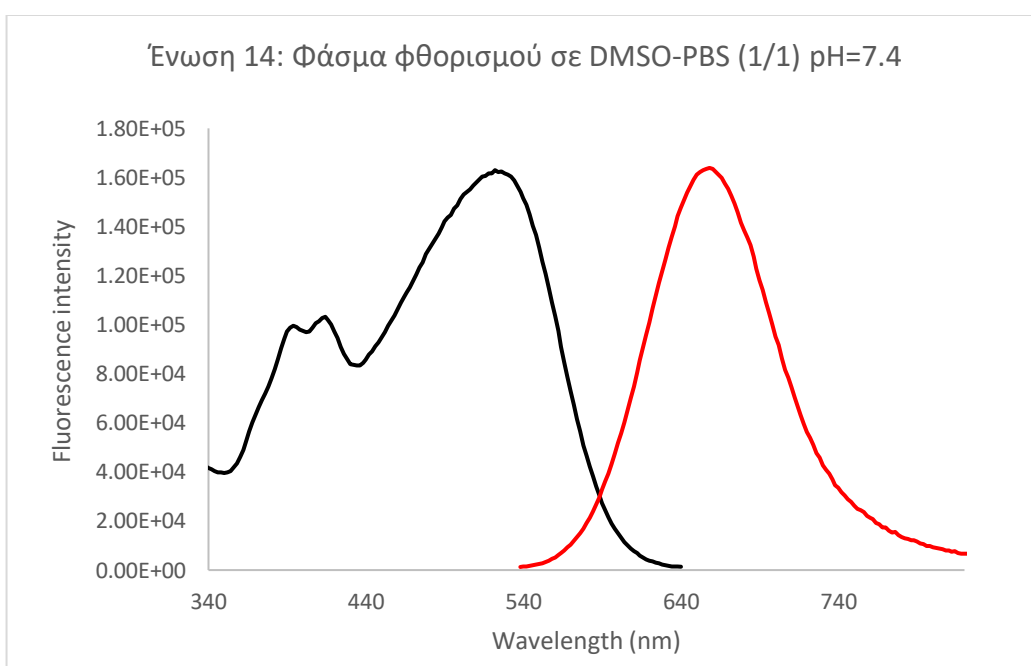
Εικόνα 101. Φάσμα μάζης υψηλής ανάλυσης της ένωσης **14**. Το m/z 386.07 αντιστοιχεί στο $[M-H]^+$

2.4.2 Φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης **14**

Προκειμένου να αξιολογήσουμε τις φασματικές ιδιότητες της ένωσης **14**, 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 φασματικές 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 506 nm. Επίσης, μελετήθηκαν τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής με λ_{exc} 524 nm και λ_{em} 662 nm. Τέλος, υπολογίστηκε η μετατόπιση Stokes ίση με 138 nm, οπότε και πάλι συμπεραίνουμε ότι ακολουθείται ο μηχανισμός ICT.



Εικόνα 102. Φάσμα απορρόφησης σε DMSO-PBS (1/1) pH=7.4 της ένωσης 14 (25°C)



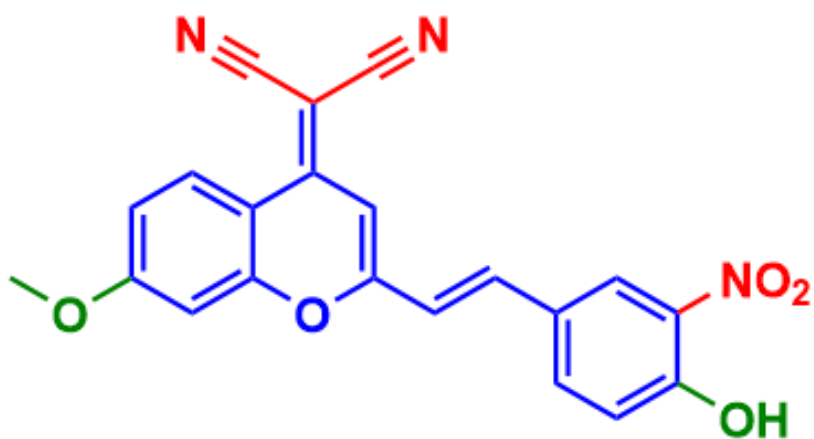
Εικόνα 103. Φάσμα φθορισμού σε DMSO-PBS (1/1) pH=7.4 της ένωσης 14 (10μM) (25°C). Με μαύρο χρώμα απεικονίζεται το φάσμα διέγερσης και με κόκκινο το φάσμα εκπομπής

Πίνακας 5. Μήκη κύματος απορρόφησης, διέγερσης, εκπομπής και μετατόπιση Stokes της ένωσης 14

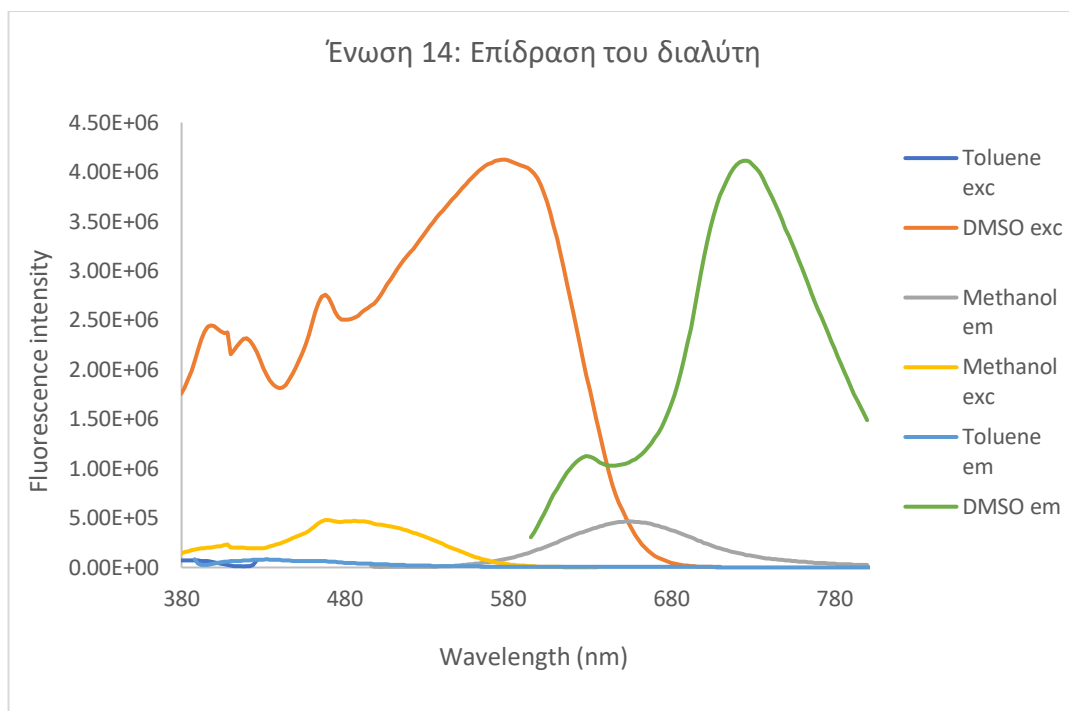
λ_{abs} (nm)	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emission}}$ (nm)	Stokes shift (nm)
506	524	662	138

2.4.2.1 Επίδραση του διαλύτη

Και η συγκεκριμένη ένωση παρουσιάζει ομάδες δότη και δέκτη, είναι δηλαδή, φθοροφόρο push-pull (ώθησης - έλξης) (**Εικόνα 104**). Για αυτό, λοιπόν, μελετήθηκε η επίδραση του διαλύτη στο φάσμα φθορισμού.



Εικόνα 104. Η δομή της ένωσης 14 όπου επισημαίνονται με πράσινο χρώμα οι δότες ηλεκτρονίων, με κόκκινο χρώμα οι δέκτες ηλεκτρονίων και με μπλε χρώμα ο συνδέτης



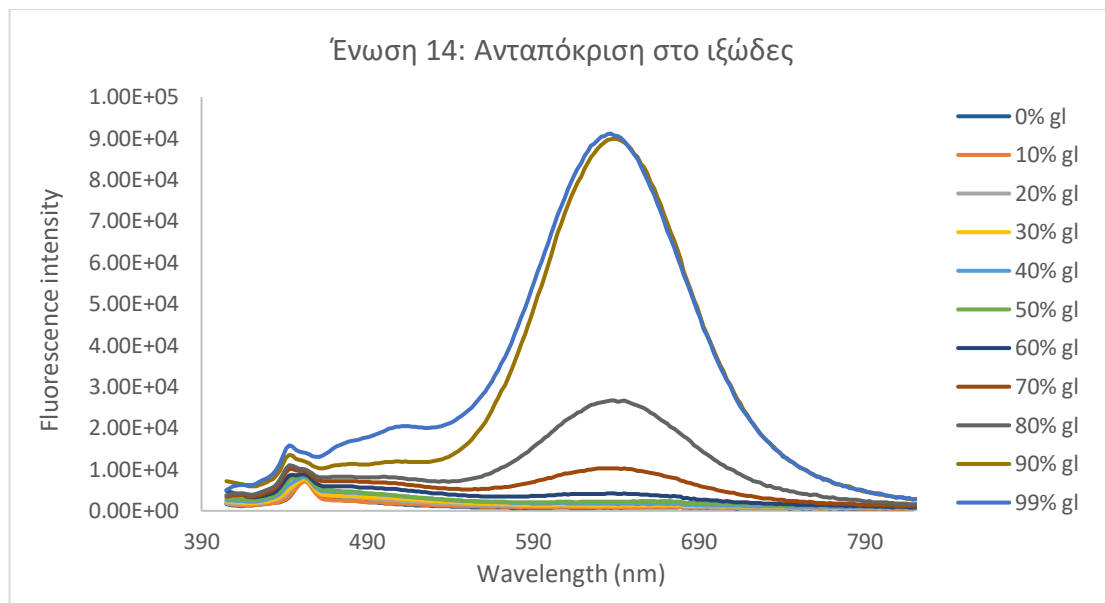
Εικόνα 105. Φάσματα εκπομπής και διέγερσης της ένωσης 14 (10μM) σε διάφορους διαλύτες (τολουόλιο, μεθανόλη, N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο) (25°C)

Πίνακας 6. Μήκη κύματος απορρόφησης και εκπομπής της ένωσης 14 συναρτήσει του διαλύτη

Διαλύτης	λ exc (nm)	λ em (nm)
Τολουόλιο (toluene) Μη πολικός διαλύτης	372	434
Διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide) Πολικός απρωτικός διαλύτης	576	730
Μεθανόλη (methanol) Πολικός πρωτικός διαλύτης	470	656

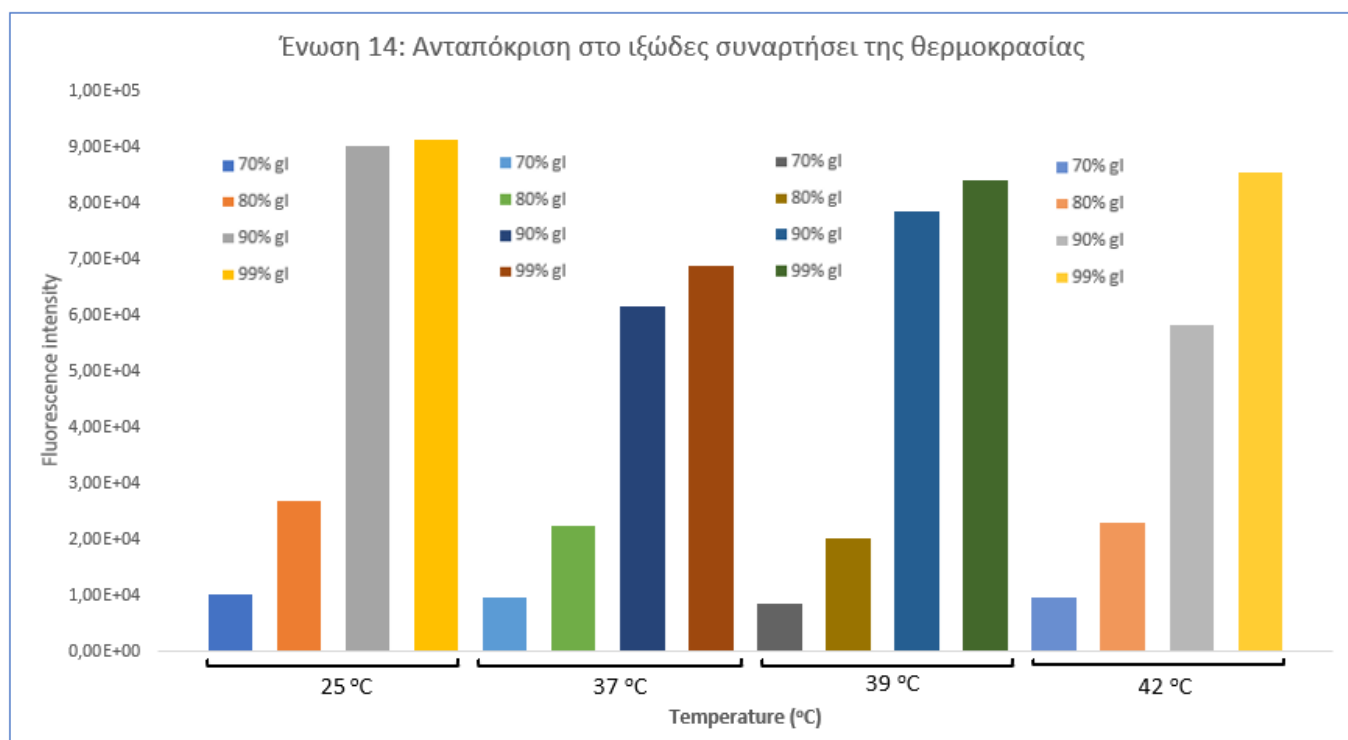
2.4.2.2 Ανταπόκριση στο ιώδες

Στη συνέχεια έγινε έλεγχος ανταπόκρισης της ένωσης **14** στη μεταβολή του ιζώδους. Σε αυτά τα υδατικά μέσα εμφανίζει ένα ασθενές σήμα φθορισμού, ενώ με σταδιακή αύξηση του ποσοστού γλυκερόλης, παρατηρήθηκε ότι το σήμα φθορισμού αυξήθηκε σημαντικά (~ **120 φορές** από το διάλυμα με 0% γλυκερόλη στο διάλυμα με 99% γλυκερόλη, στα 643 nm).

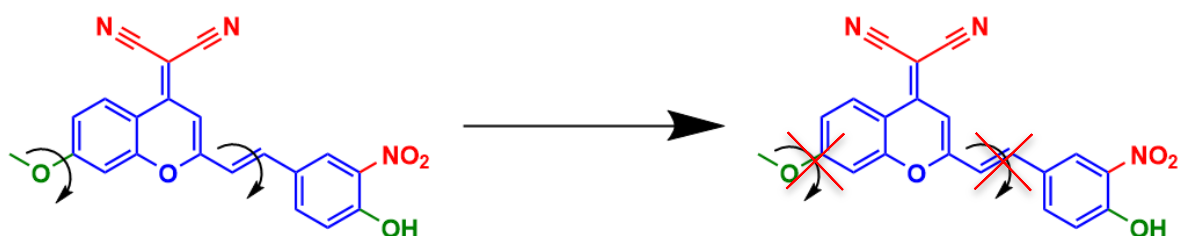


Εικόνα 106. Φάσματα φθορισμού της ένωσης **14** (10μM) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης-νερού (από 0% έως 99% γλυκερόλη) κατόπιν διέγερσης στα 520 nm (25°C)

Στη συνέχεια, δεδομένου πως το ιζώδες επηρεάζεται σημαντικά από τη μεταβολή της θερμοκρασίας πραγματοποιήθηκαν συμπληρωματικές μελέτες σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 107**, η διαφορά της έντασης του σήματος φθορισμού της ένωσης **14** στα διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού διατηρείται σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις παρά το γεγονός ότι η θερμοκρασία αυξάνεται σημαντικά από 25 °C σε 42 °C.



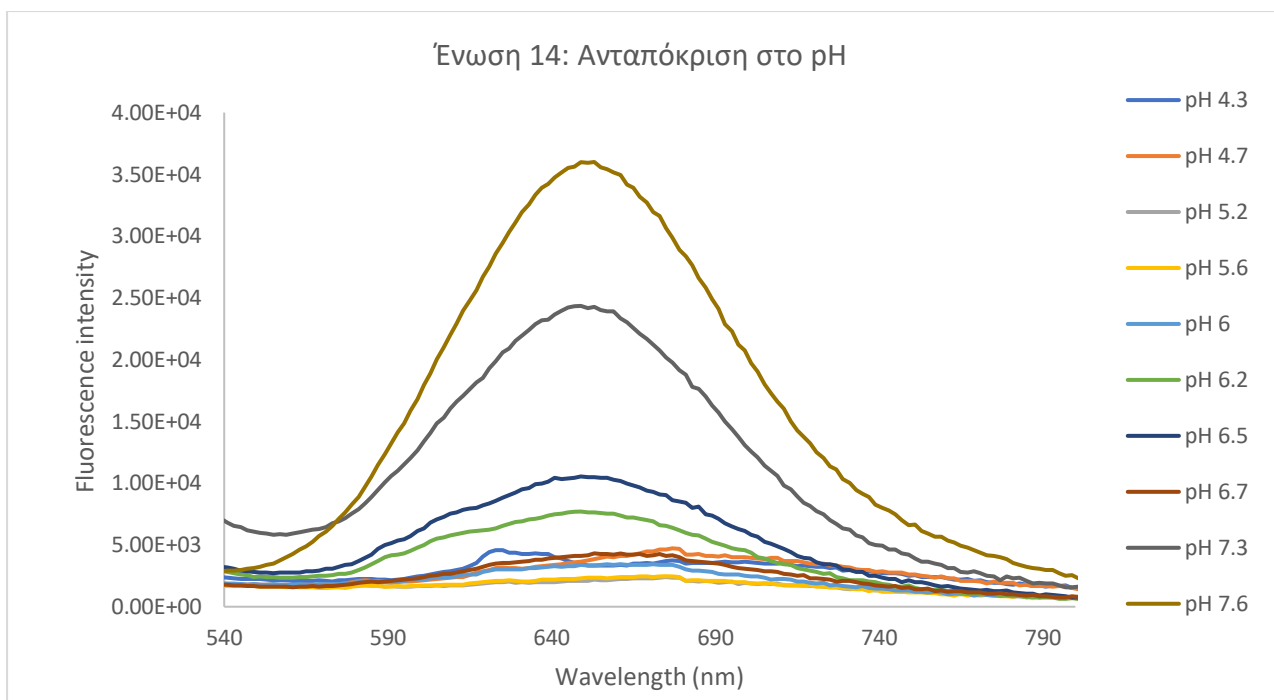
Εικόνα 107. Συσχέτιση της μεταβολής της έντασης του φθορισμού της ένωσης 14 (10μΜ) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα νερού γλυκερόλης με τη θερμοκρασία



Εικόνα 108. Περιστροφή των ομάδων σε συνθήκες χαμηλού ιώδους (αριστερά) και παρεμπόδιση αυτής της διαδικασίας σε συνθήκες υψηλού ιώδους (δεξιά)

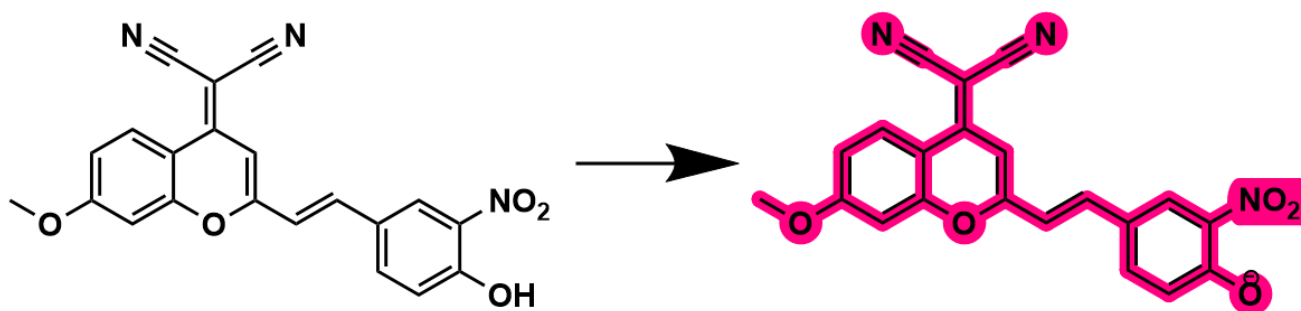
2.4.2.3 Ανταπόκριση στο pH

Ακολούθησαν πειράματα σε διαφορετικά pH, για να μελετήσουμε την συμπεριφορά της ένωσης. Οι μετρήσεις έγιναν σε διαλύματα DMSO-PBS (1/3) στους 25°C με τελική συγκέντρωση της ένωσης στα 10μΜ.



Εικόνα 109. Φάσματα φθορισμού της ένωσης 14 (10 μ M) σε διαφορετικά επίπεδα pH κατόπιν διέγερσης στα 450 nm (25°C)

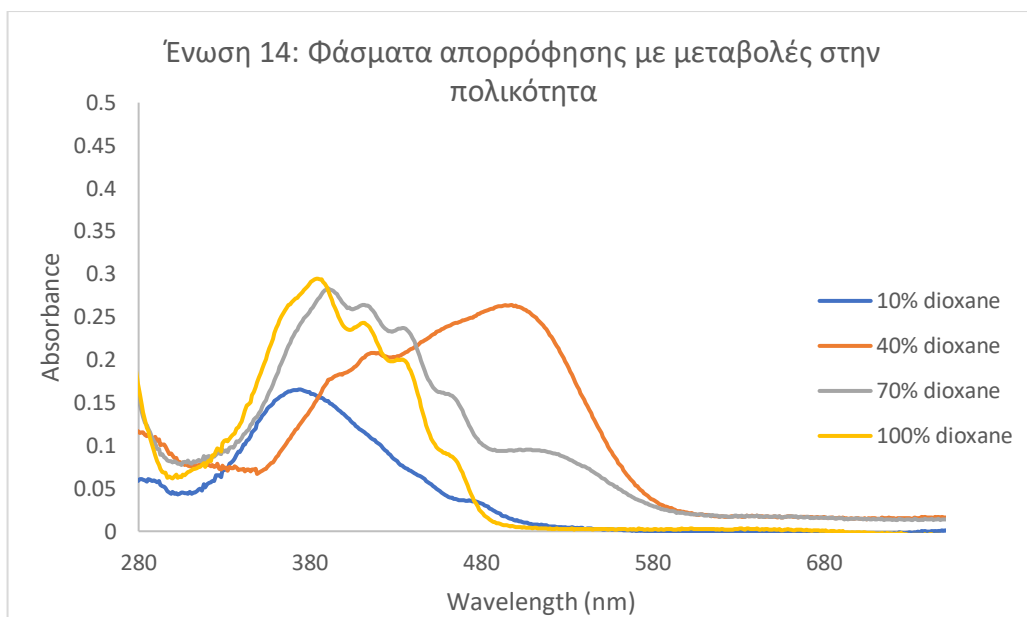
Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 109**, παρατηρείται αύξηση του φθορισμού κατά **16 φορές** όσο αυξάνεται το pH του διαλύματος. Αυτό πιθανώς να οφείλεται σε αποπρωτονίωση της υδροξυλομάδας, γεγονός που αλλάζει τις ιδιότητές της ως δότη.



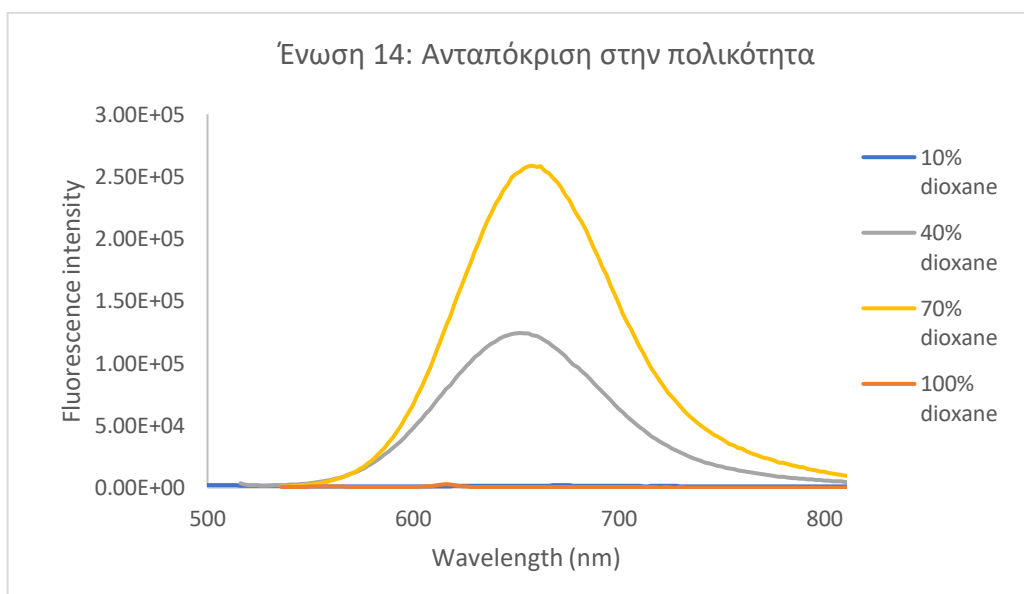
Εικόνα 110. Αύξηση του φθορισμού της ένωσης 14 σε υψηλά pH με αποπρωτονίωση της υδροξυλομάδας

2.4.2.4 Ανταπόκριση στην πολικότητα

Ερευνήσαμε την ικανότητα της ένωσης **14** στο να ανιχνεύει αλλαγές στην πολικότητα. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού σε κάποια ενδεικτικά δυαδικά συστήματα 1,4-διοξανίου-νερού (10%, 40%, 70%, 100% διοξάνιο), όπου η διηλεκτρική σταθερά (ϵ) ελαττώνεται.



Εικόνα 111. Φάσματα απορρόφησης της ένωσης 14 (10 μ M) σε διάφορα συστήματα 1,4-διοξανίου-νερού (25°C)



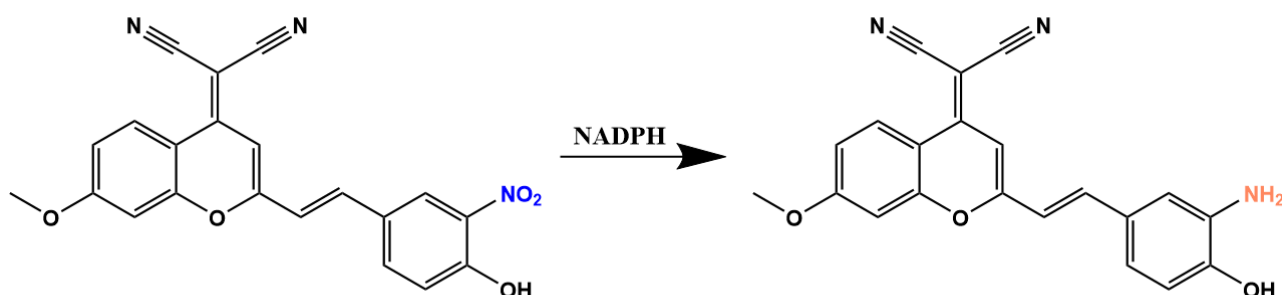
Εικόνα 112. Φάσματα φθορισμού της ένωσης 14 (10 μ M) σε διάφορα συστήματα 1,4-διοξανίου-νερού (25°C)

Όπως βλέπουμε και στην **Εικόνα 112**, με την μείωση της πολικότητας του συστήματος (10% διοξάνιο μέχρι 70% διοξάνιο), ο φθορισμός της ένωσης αυξάνεται κατά **177 φορές** και σε 100% διοξάνιο παρατηρούμε την απόσβεση του φθορισμού, όπως έγινε προηγουμένως και στο τολουόλιο (αυτό συμβαίνει, δηλαδή, στους άπολους διαλύτες όπως το τολουόλιο και το 1,4-διοξάνιο).

2.4.2.5 Έλεγχος ανταπόκρισης στο συνένζυμο NADPH

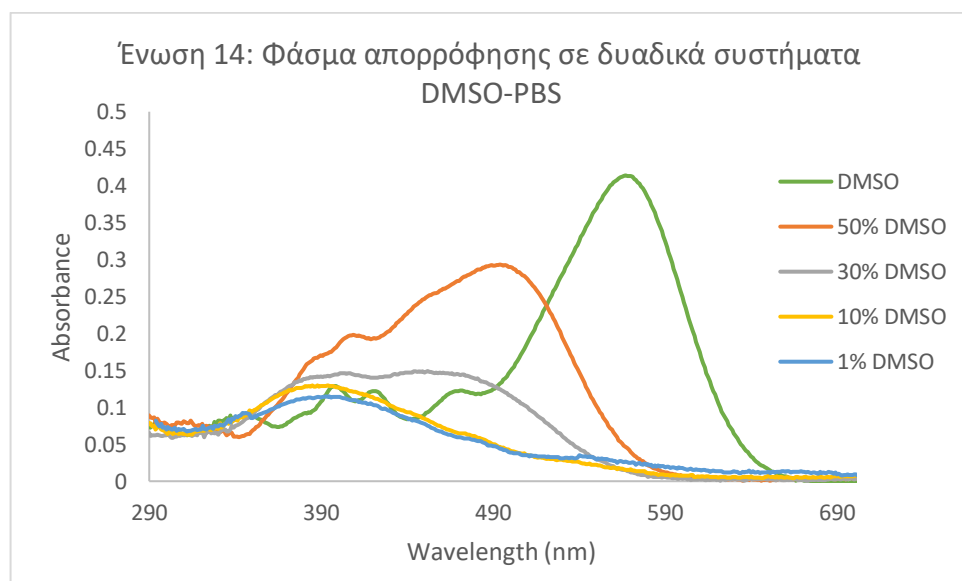
Το ανηγμένο φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης (NADPH) είναι ένα συνένζυμο που υπάρχει σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Ως φορέας ηλεκτρονίων συμμετέχει σε πολλές βιολογικές διαδικασίες, όπως ο μεταβολισμός, η λειτουργία των μιτοχονδρίων, η έκφραση γονιδίων, η ομοιόσταση του ασβεστίου, η καρκινογένεση και ο κυτταρικός θάνατος. Επίσης, μεταβολές στα επίπεδα του NADPH συνδέονται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως ο διαβήτης και ο καρκίνος. Έτσι λοιπόν, η ανίχνευση και η παρακολούθηση των επιπέδων NADPH στο κύτταρο είναι σημαντική για την βαθύτερη κατανόηση των παραπάνω διαδικασιών [104].

Ένας τρόπος για να επιτευχθεί αυτό είναι με απεικόνιση μέσω φθορισμού. Με αυτήν την αφορμή, υποθέσαμε ότι η ένωση **14** μπορεί να υποστεί αναγωγή από το συνένζυμο NADPH και η νιτρο-ομάδα να μετατραπεί σε αμινομάδα, προκαλώντας αλλαγή στις φωτοφυσικές ιδιότητες του μορίου (**Εικόνα 113**).



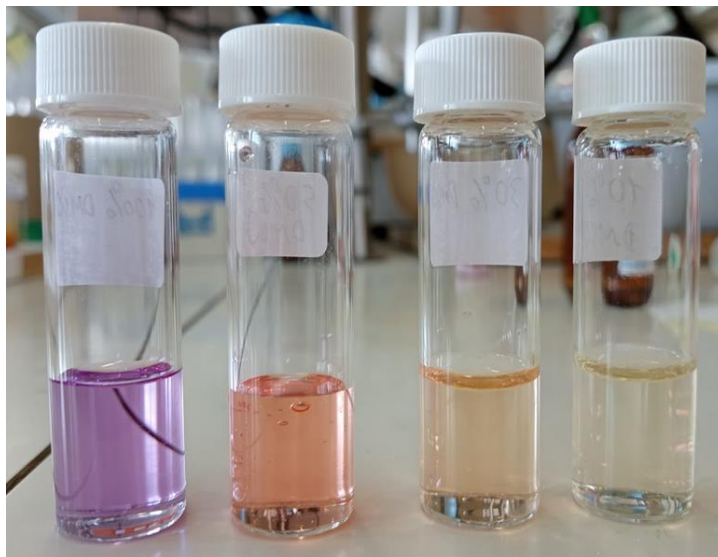
Εικόνα 113. Αναγωγή της νιτρο-ομάδας σε αμινομάδα από το συνένζυμο NADPH

Όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφία ([104],[105],[106]) όλα τα πειράματα με NADPH γίνονται σε διάλυμα 100% PBS ή 0.5% DMSO και 99.5% PBS, pH =7.4 και θερμοκρασία στους 37°C για λόγους διαλυτότητας του συνενζύμου. Συνεπώς, είναι απαραίτητο να μελετήσουμε τη συμπεριφορά της ένωσης **14** σε διάφορα συστήματα DMSO-PBS. Για το σκοπό αυτό ετοιμάσαμε δυαδικά συστήματα DMSO-PBS και λάβαμε τα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού για την ένωση **14**.



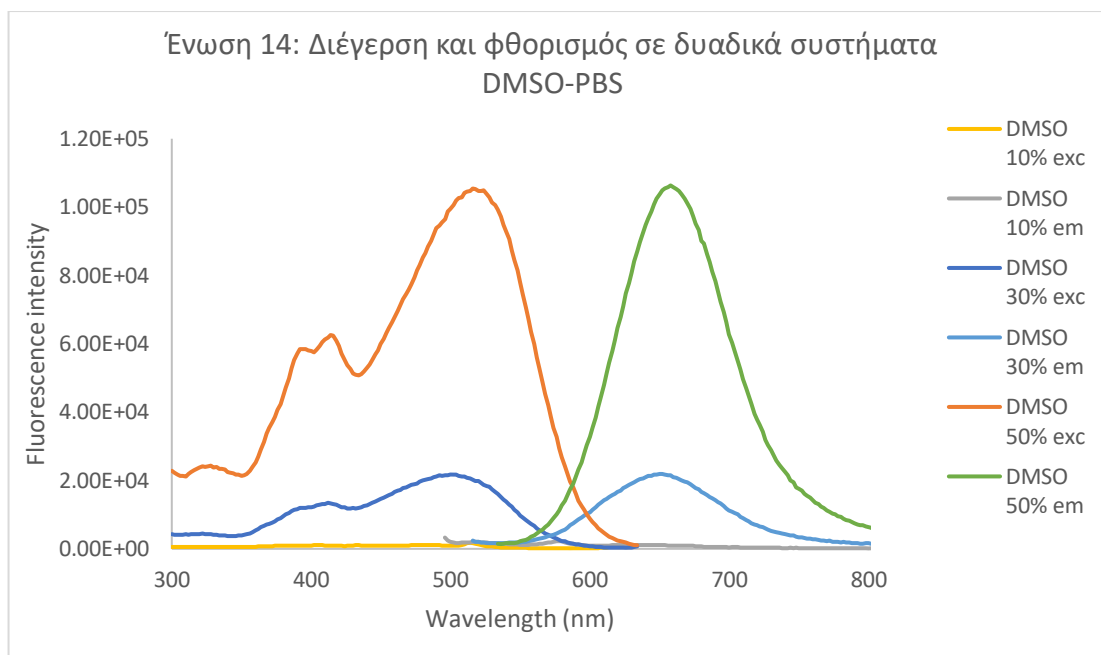
Εικόνα 114. Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 14 (10μM) σε δυαδικά συστήματα DMSO-PBS (pH=7.4)

Στην **Εικόνα 114** παρατηρούμε ότι η ένωση **14** παρουσιάζει μία καθαρή κορυφή στο φάσμα απορρόφησης στα 575nm. Όσο αυξάνεται το ποσοστό του νερού, βλέπουμε ότι η κορυφή απορρόφησης μειώνεται σε ένταση και μετατοπίζεται σε χαμηλότερα μήκη κύματος. Στα ποσοστά 10% και 1% η ένωση **14** εμφανίζει μικρή διαλυτότητα, γεγονός που δικαιολογείται και από τη δομή της, αφού δεν περιμένουμε να είναι υδατοδιαλυτή.



Εικόνα 115. Διαλύματα της ένωσης **14** που αποτελούνται από DMSO-PBS. Η σειρά των διαλυμάτων από αριστερά προς δεξιά: 100% DMSO, 50% DMSO, 30% DMSO, 10% DMSO

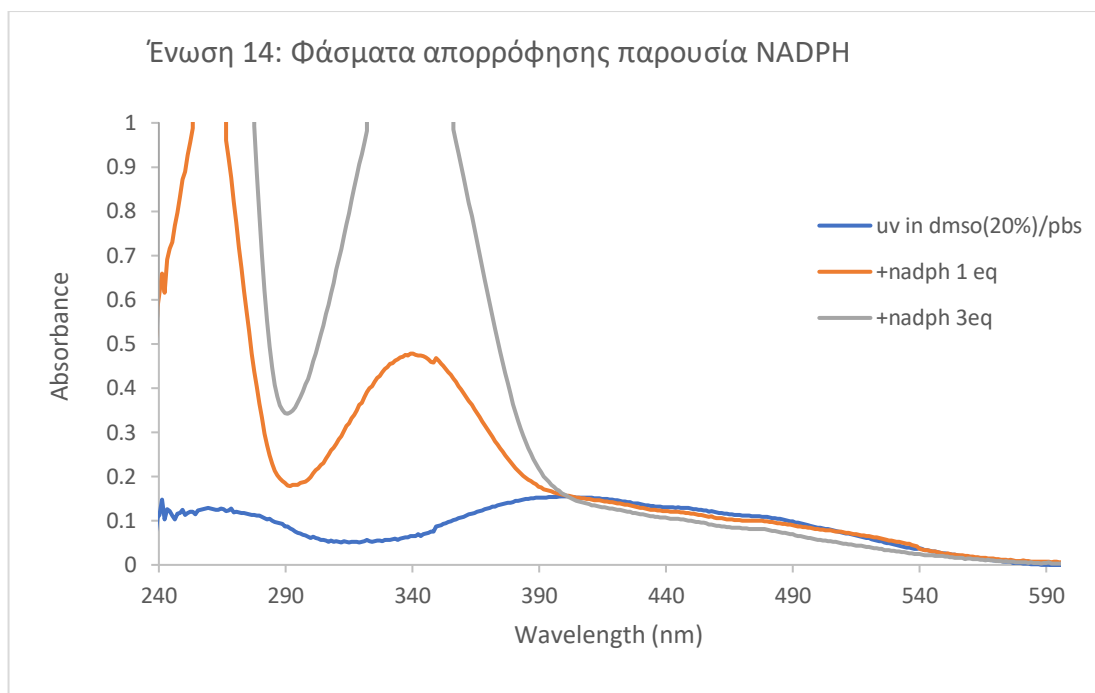
Στην **Εικόνα 116** βλέπουμε τα φάσματα διέγερσης και φθορισμού της ένωσης **14** σε 10%, 30% και 50% DMSO σε PBS. Γίνεται αντιληπτό ότι στο διάλυμα 10% DMSO σε PBS ο φθορισμός της ένωσης αποσβένει, πιθανώς λόγω μικρής διαλυτότητας της ένωσης.



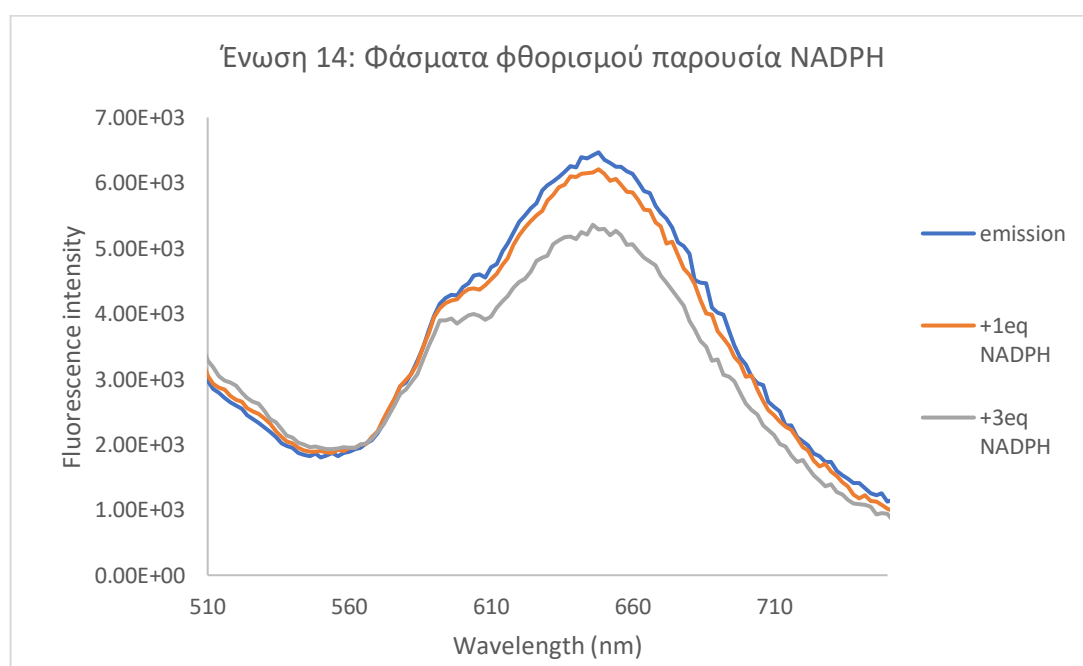
Εικόνα 116. Φάσματα διέγερσης και φθορισμού της ένωσης 14 (10 μ M) σε δυαδικά συστήματα DMSO-PBS (pH=7.4)

Από τα παραπάνω δεδομένα συμπεραίνουμε ότι δεν μπορούμε να πραγματοποιήσουμε τα πειράματα με την ένωση **14** και το συνένζυμο NADPH σε διάλυμα 100% PBS καθώς η ένωσή μας δεν εμφανίζει ιδανική διαλυτότητα σε αυτό το σύστημα.

Έτσι λοιπόν, δοκιμάσαμε το παραπάνω πείραμα σε σύστημα DMSO (20%) -PBS (80%) για να εμφανίζει κάποια διαλυτότητα η ένωση **14**. Έγιναν μετρήσεις του φάσματος απορρόφησης και φθορισμού της ένωσης **14** (10 μ M) στο συγκεκριμένο σύστημα διαλυτών απουσία και παρουσία NADPH στους 37°C και pH=7.4. Το ένα ισοδύναμο NADPH αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50 μ M, όπως συμβαίνει σε αντίστοιχες μετρήσεις στη βιβλιογραφία.



Εικόνα 117. Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 14 (10uM) απουσία και παρουσία NADPH (37°C, pH=7.4). Έχει γίνει εστίαση σε τιμές απορρόφησης <1 ώστε να ισχύει ο νόμος του Lambert-Beer και να εμφανίζεται καθαρά η απορρόφηση της ένωσης 14



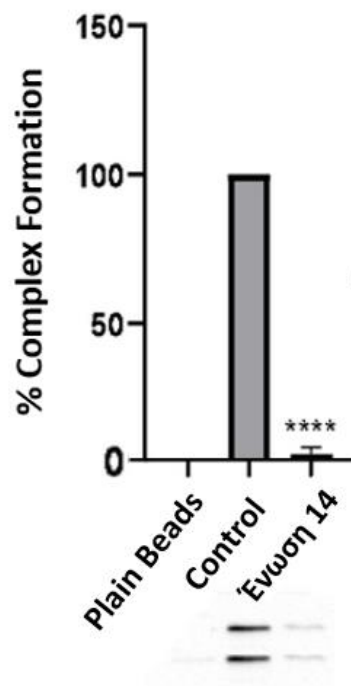
Εικόνα 118. Φάσμα απορρόφησης της ένωσης 14 (10uM) απουσία και παρουσία NADPH (37°C, pH=7.4)

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι δεν εμφανίζεται κάποια μεταβολή στα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού της ένωσης **14** που θα υποδήλωνε αναγωγή της από το NADPH. Στο φάσμα απορρόφησης (**Εικόνα 118**) οι μόνες μεταβολές που παρατηρούνται οφείλονται στην αύξηση των ισοδυνάμων του

NADPH στην κυψελίδα. Έτσι λοιπόν, είτε η ένωση **14** δεν αποτελεί υπόστρωμα για το συνένζυμο NADPH είτε το συνένζυμο χάνει τη δραστηριότητά του στο συγκεκριμένο σύστημα διαλυτών.

2.4.3 Αξιολόγηση της ένωσης **14** ως προς την ικανότητα αναστολής σχηματισμού του συμπλόκου Myc-Max

Ακολούθησε αξιολόγηση της ένωσης **14** ως προς την αναστολή σχηματισμού του συμπλόκου Myc-Max, με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Στην **Εικόνα 119** παρατηρείται ότι για την ένωση **14** εμφανίζεται πολύ μικρή ένταση στο σήμα της ανοσοαποτύπωσης γεγονός που αποδεικνύει ότι προσδένεται πολύ ισχυρά με την πρωτεΐνη Myc αποτρέποντας τον σχηματισμό του συμπλόκου με την Max.



Εικόνα 119. Ποσοστό σχηματισμού του συμπλόκου με κενά σφαιρίδια γλουταθειόνης, χωρίς προεπώαση με την ένωση **14**, έπειτα από προεπώαση με την ένωση **14** καθώς και η ανοσοαποτύπωση με χρήση αντισώματος έναντι της Max

Κεφάλαιο 3: Συμπεράσματα και συζήτηση

Συμπερασματικά, λοιπόν, σχεδιάσαμε, συνθέσαμε και αξιολογήσαμε τέσσερις ενώσεις -ένωση **8**, ένωση **9**, ένωση **13** και ένωση **14**- οι οποίες στοχεύουν στην αναστολή της αλληλεπίδρασης των ογκογονικών πρωτεϊνών Myc – Max. Το ογκογονίδιο Myc απορρυθμίζεται στο 70% των καρκίνων του ανθρώπου, όπως του πνεύμονα, του μαστού και του παχέος εντέρου. Λόγω του κεντρικού του ρόλου στις διαδικασίες του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης και της διαφοροποίησης, η πρωτεΐνη Myc αποτελεί ένα σημαντικό

στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου. Αν και η αναστολή της Mgc θα ήταν μια εξαιρετική προσέγγιση, η άμεση στόχευσή της φαίνεται δύσκολη λόγω της δομής της. Οι ενώσεις **8**, **13** και **14** βρέθηκε ότι αναστέλλουν αποτελεσματικά τον σχηματισμό του διμερούς Mgc-Max. Η ένωση **8**, μάλιστα, όπως αποδείχθηκε, ανταποκρίνεται στη μεταβολή του ιξώδους μεταβάλλοντας το σήμα φθορισμού της. Έτσι λοιπόν, μπορούμε να υποθέσουμε ότι μετά την πρόσδεσή της στην πρωτεΐνη Mgc, λόγω περιορισμού της ελεύθερης περιστροφής της, θα παρατηρηθεί μεταβολή του φθορισμού της ένωσης.

Όσον αφορά την ένωση **14**, βρέθηκε ότι ανταποκρίνεται εξαιρετικά σε μεταβολές του ιξώδους (**120 φορές**), του pH (**16 φορές**) και της πολικότητας (**177 φορές**). Διαθέτει, δηλαδή, τρεις πολύ σημαντικές ιδιότητες των διαγνωστικών ενώσεων. Το γεγονός αυτό μας δίνει το κίνητρο να μελετήσουμε λεπτομερώς τη δομή και τα χαρακτηριστικά της ένωσης **14** ώστε να σχεδιάσουμε και να συνθέσουμε περισσότερα ανάλογα που να ανταποκρίνονται σε ιξώδες, μεταβολές του pH και της πολικότητας.

Όλες οι ενώσεις που συντέθηκαν εμφανίζουν φάσμα φθορισμού (σε PBS-DMSO) σε μήκη κύματος πάνω από τα 650 nm, κοντά στην περιοχή του εγγύς υπέρυθρου, όπως είναι επιθυμητό για τους αναστολείς μικρού μοριακού βάρους.

Στα άμεσα πλάνα είναι η μελέτη περισσότερων μορίων που θα συνδυάζουν χαρακτηριστικά των παραπάνω ενώσεων, για να διαμορφώσουμε ένα «μοτίβο» από δομικά κομμάτια που έχουν ενεργό ρόλο στην αναστολή σχηματισμού του συμπλόκου Mgc-Max. Επίσης, αποτελεί προτεραιότητα η τροποποίηση των υπάρχοντων μορίων με σκοπό την προσθήκη κάποιας ομάδας για στόχευση των καρκινικών κυττάρων και την αύξηση της υδατοδιαλυτότητάς τους.

Κεφάλαιο 4: Βιβλιογραφία

- [1] H. Sung *et al.*, “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 71, no. 3, 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [2] R. L. Siegel, K. D. Miller, N. S. Wagle, and A. Jemal, “Cancer statistics, 2023,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 73, no. 1, 2023, doi: 10.3322/caac.21763.
- [3] N. H. Othman, “Honey and cancer: Sustainable inverse relationship particularly for developing nations-a review,” *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012. 2012, doi: 10.1155/2012/410406.
- [4] S. Wu, W. Zhu, P. Thompson, and Y. A. Hannun, “Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors,” *Nature Communications*, vol. 9, no. 1. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-05467-z.
- [5] A. Baba and C. Cătoi, “Comparative Oncology. Chapter 3, TUMOR CELL MORPHOLOGY,” in *Comparative Oncology*, 2007.

- [6] H. Yamasaki, "Multistage carcinogenesis: implications for risk estimation," *CANCER METASTASIS Rev.*, vol. 7, no. 1, 1988, doi: 10.1007/BF00048275.
- [7] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The hallmarks of cancer," *Cell*, vol. 100, no. 1. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- [8] Y. A. Fouad and C. Aanei, "Revisiting the hallmarks of cancer," *American Journal of Cancer Research*, vol. 7, no. 5. 2017.
- [9] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [10] N. A. Bhowmick, E. G. Neilson, and H. L. Moses, "Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression," *Nature*, vol. 432, no. 7015. 2004, doi: 10.1038/nature03096.
- [11] N. Cheng, A. Chytil, Y. Shyr, A. Joly, and H. L. Moses, "Transforming growth factor- β signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion," *Mol. Cancer Res.*, vol. 6, no. 10, 2008, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-2203.
- [12] A. H. Wyllie, J. F. R. Kerr, and A. R. Currie, "Cell Death: The Significance of Apoptosis," *Int. Rev. Cytol.*, vol. 68, no. C, 1980, doi: 10.1016/S0074-7696(08)62312-8.
- [13] C. C. Harris, "p53 tumor suppressor gene: From the basic research laboratory to the clinic - An abridged historical perspective," *Carcinogenesis*, vol. 17, no. 6. 1996, doi: 10.1093/carcin/17.6.1187.
- [14] D. Hanahan and J. Folkman, "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis," *Cell*, vol. 86, no. 3. 1996, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80108-7.
- [15] N. Bouck, V. Stellmach, and S. C. Hsu, "How tumors become angiogenic," *Advances in Cancer Research*, vol. 69. 1996, doi: 10.1016/s0065-230x(08)60862-3.
- [16] T. Veikkola and K. Alitalo, "VEGFs, receptors and angiogenesis," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 9, no. 3, 1999, doi: 10.1006/scbi.1998.0091.
- [17] H. A. Bull, P. M. Brickell, and P. M. Dowd, "src-related protein tyrosine kinases are physically associated with the surface antigen CD36 in human dermal microvascular endothelial cells," *FEBS Lett.*, vol. 351, no. 1, 1994, doi: 10.1016/0014-5793(94)00814-0.
- [18] L. Hayflick, "Mortality and immortality at the cellular level. A review," *Biochem.*, vol. 62, no. 11, 1997.
- [19] M. B. Sporn, "The war on cancer," *Lancet*, vol. 347, no. 9012, 1996, doi: 10.1016/S0140-6736(96)91015-6.
- [20] G. Berx and F. van Roy, "Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer.," *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 1, no. 6. 2009, doi: 10.1101/cshperspect.a003129.
- [21] U. Cavallaro and G. Christofori, "Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer," *Nature Reviews Cancer*, vol. 4, no. 2. 2004, doi: 10.1038/nrc1276.
- [22] S. Weinhouse, O. Warburg, D. Burk, and A. L. Schade, "On respiratory impairment in cancer cells," *Science (80-.)*, vol. 124, no. 3215, 1956, doi:

- 10.1126/science.124.3215.267.
- [23] O. Warburg, "On the origin of cancer cells," *Science* (80-), vol. 123, no. 3191, 1956, doi: 10.1126/science.123.3191.309.
 - [24] R. G. Jones and C. B. Thompson, "Tumor suppressors and cell metabolism: A recipe for cancer growth," *Genes and Development*, vol. 23, no. 5. 2009, doi: 10.1101/gad.1756509.
 - [25] R. J. DeBerardinis, J. J. Lum, G. Hatzivassiliou, and C. B. Thompson, "The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation," *Cell Metabolism*, vol. 7, no. 1. 2008, doi: 10.1016/j.cmet.2007.10.002.
 - [26] P. P. Hsu and D. M. Sabatini, "Cancer cell metabolism: Warburg and beyond," *Cell*, vol. 134, no. 5. 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.08.021.
 - [27] O. Feron, "Pyruvate into lactate and back: From the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells," *Radiotherapy and Oncology*, vol. 92, no. 3. 2009, doi: 10.1016/j.radonc.2009.06.025.
 - [28] G. L. Semenza, "Tumor metabolism: Cancer cells give and take lactate," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 118, no. 12. 2008, doi: 10.1172/JCI37373.
 - [29] K. M. Kennedy and M. W. Dewhirst, "Tumor metabolism of lactate: The influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation," *Future Oncology*, vol. 6, no. 1. 2010, doi: 10.2217/fon.09.145.
 - [30] D. Hanahan, "Hallmarks of Cancer: New Dimensions," *Cancer Discovery*, vol. 12, no. 1. 2022, doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
 - [31] M. Truffi, L. Sorrentino, and F. Corsi, "Fibroblasts in the Tumor Microenvironment," in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 1234, 2020.
 - [32] N. M. Anderson and M. C. Simon, "The tumor microenvironment," *Current Biology*, vol. 30, no. 16. 2020, doi: 10.1016/j.cub.2020.06.081.
 - [33] R. H. Thomlinson and L. H. Gray, "The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy," *Br. J. Cancer*, vol. 9, no. 4, 1955, doi: 10.1038/bjc.1955.55.
 - [34] M. Müller *et al.*, "Renocortical tissue oxygen pressure measurements in patients undergoing living donor kidney transplantation," *Anesth. Analg.*, vol. 87, no. 2, 1998, doi: 10.1097/00000539-199808000-00045.
 - [35] K. Schlenger and P. Vaupel, "Oxygenation of Carcinomas of the Uterine Cervix: Evaluation by Computerized O₂ Tension Measurements," *Cancer Res.*, vol. 51, no. 22, 1991.
 - [36] G. L. Semenza and G. L. Wang, "A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 12, no. 12, 1992, doi: 10.1128/mcb.12.12.5447-5454.1992.
 - [37] P. H. Maxwell *et al.*, "The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis," *Nature*, vol. 399, no. 6733, 1999, doi: 10.1038/20459.
 - [38] B. L. Krock, N. Skuli, and M. C. Simon, "Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and

- Evil," *Genes and Cancer*, vol. 2, no. 12, 2011, doi: 10.1177/1947601911423654.
- [39] B. Keith and M. C. Simon, "Hypoxia-Inducible Factors, Stem Cells, and Cancer," *Cell*, vol. 129, no. 3, 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.04.019.
- [40] M. V. Liberti and J. W. Locasale, "The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 41, no. 3, 2016, doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.001.
- [41] A. A. Shestov *et al.*, "Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step," *Elife*, vol. 3, no. July2014, 2014, doi: 10.7554/eLife.03342.
- [42] Z. Shi, Q. Li, and L. Mei, "pH-Sensitive nanoscale materials as robust drug delivery systems for cancer therapy," *Chinese Chem. Lett.*, vol. 31, no. 6, 2020, doi: 10.1016/j.ccllet.2020.03.001.
- [43] M. Damaghi, J. W. Wojtkowiak, and R. J. Gillies, "pH sensing and regulation in cancer," *Frontiers in Physiology*, vol. 4 DEC. 2013, doi: 10.3389/fphys.2013.00370.
- [44] J. Wu, "The enhanced permeability and retention (Epr) effect: The significance of the concept and methods to enhance its application," *Journal of Personalized Medicine*, vol. 11, no. 8, 2021, doi: 10.3390/jpm11080771.
- [45] H. F. Dvorak, J. A. Nagy, J. T. Dvorak, and A. M. Dvorak, "Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules," *Am. J. Pathol.*, vol. 133, no. 1, 1988.
- [46] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori, "Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review," *J. Control. Release*, vol. 65, no. 1–2, 2000, doi: 10.1016/S0168-3659(99)00248-5.
- [47] Y. Matsumura and H. Maeda, "A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs," *Cancer Res.*, vol. 46, no. 8, 1986.
- [48] H. Maeda, H. Nakamura, and J. Fang, "The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 65, no. 1, 2013, doi: 10.1016/j.addr.2012.10.002.
- [49] R. K. Jain, "Determinants of Tumor Blood Flow: A Review," *Cancer Res.*, vol. 48, no. 10, 1988.
- [50] J. Yin, X. Kong, and W. Lin, "Noninvasive Cancer Diagnosis in Vivo Based on a Viscosity-Activated Near-Infrared Fluorescent Probe," *Anal. Chem.*, vol. 93, no. 4, 2021, doi: 10.1021/acs.analchem.0c03803.
- [51] K. Bera *et al.*, "Extracellular fluid viscosity enhances cell migration and cancer dissemination," *Nature*, vol. 611, no. 7935, 2022, doi: 10.1038/s41586-022-05394-6.
- [52] H. Xiao, P. Li, and B. Tang, "Small Molecular Fluorescent Probes for Imaging of Viscosity in Living Biosystems," *Chemistry - A European Journal*, vol. 27, no. 23, 2021, doi: 10.1002/chem.202004888.
- [53] A. Petrič, A. F. Jacobson, and J. R. Barrio, "Functionalization of a viscosity-sensitive fluorophore for probing of biological systems," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 8, no. 12, 1998, doi: 10.1016/S0960-894X(98)00241-8.

- [54] C. Liu *et al.*, "Far-Red Fluorophore for Monitoring Viscosity In Vitro , In Vivo , and Ex Vivo and Dynamic Tracking of Lipid Droplets in Live Systems ," *ACS Appl. Opt. Mater.*, 2023, doi: 10.1021/acsaom.3c00010.
- [55] C. Ma *et al.*, "A minireview of viscosity-sensitive fluorescent probes: Design and biological applications," *J. Mater. Chem. B*, vol. 8, no. 42, 2020, doi: 10.1039/d0tb01146k.
- [56] Y. Ji *et al.*, "Cell-Permeable Fluorogenic Probes for Identification and Imaging Nitroreductases in Live Bacterial Cells," *J. Org. Chem.*, vol. 84, no. 3, 2019, doi: 10.1021/acs.joc.8b02746.
- [57] D. Yang, H. Y. Tian, T. N. Zang, M. Li, Y. Zhou, and J. F. Zhang, "Hypoxia imaging in cells and tumor tissues using a highly selective fluorescent nitroreductase probe," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-09525-2.
- [58] A. Chevalier, Y. Zhang, O. M. Khmour, J. B. Kaye, and S. M. Hecht, "Mitochondrial Nitroreductase Activity Enables Selective Imaging and Therapeutic Targeting," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 138, no. 37, 2016, doi: 10.1021/jacs.6b06229.
- [59] Y. Zhou, J. F. Zhang, and J. Yoon, "Fluorescence and colorimetric chemosensors for fluoride-ion detection," *Chemical Reviews*, vol. 114, no. 10. 2014, doi: 10.1021/cr400352m.
- [60] Y. Zhou and J. Yoon, "ChemInform Abstract: Recent Progress in Fluorescent and Colorimetric Chemosensors for Detection of Amino Acids," *ChemInform*, vol. 43, no. 13, 2012, doi: 10.1002/chin.201213278.
- [61] R. R. Allison, G. H. Downie, R. Cuenca, X. H. Hu, C. J. H. Childs, and C. H. Sibata, "Photosensitizers in clinical PDT," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 1, no. 1, 2004, doi: 10.1016/S1572-1000(04)00007-9.
- [62] S. B. Brown, E. A. Brown, and I. Walker, "The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment," *Lancet Oncology*, vol. 5, no. 8. 2004, doi: 10.1016/S1470-2045(04)01529-3.
- [63] V. Martos, P. Castreño, J. Valero, and J. de Mendoza, "Binding to protein surfaces by supramolecular multivalent scaffolds," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 12, no. 6. 2008, doi: 10.1016/j.cbpa.2008.08.024.
- [64] S. Kaneko, S. Fujimoto, H. Yamaguchi, T. Yamauchi, T. Yoshimoto, and K. Tokuda, "Photodynamic Therapy of Malignant Gliomas," *Prog. Neurol. Surg.*, vol. 32, 2018, doi: 10.1159/000469675.
- [65] P. Agostinis *et al.*, "Photodynamic therapy of cancer: An update," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 61, no. 4, 2011, doi: 10.3322/caac.20114.
- [66] X. Tan, S. Luo, D. Wang, Y. Su, T. Cheng, and C. Shi, "A NIR heptamethine dye with intrinsic cancer targeting, imaging and photosensitizing properties," *Biomaterials*, vol. 33, no. 7, 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.11.081.
- [67] L. Josephson, M. F. Kircher, U. Mahmood, Y. Tang, and R. Weissleder, "Near-infrared fluorescent nanoparticles as combined MR/optical imaging probes," *Bioconjug. Chem.*, vol. 13, no. 3, 2002, doi: 10.1021/bc015555d.
- [68] N. Viet Long, C. Minh Thi, and M. Nogami, "The Recent Patents and Highlights of Functionally Engineered Nanoparticles for Potential Applications in Biology, Medicine,

- and Nanomedicine," *Curr. Phys. Chem.*, vol. 4, no. 2, 2014, doi: 10.2174/18779468113039990007.
- [69] S. Gross and D. Piwnica-Worms, "Molecular imaging strategies for drug discovery and development," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 10, no. 4. 2006, doi: 10.1016/j.cbpa.2006.06.028.
 - [70] B. Oswald, F. Lehmann, L. Simon, E. Terpetschnig, and O. S. Wolfbeis, "Red laser-induced fluorescence energy transfer in an immunosystem," *Anal. Biochem.*, vol. 280, no. 2, 2000, doi: 10.1006/abio.2000.4553.
 - [71] V. Saxena, M. Sadoqi, and J. Shao, "Degradation kinetics of indocyanine green in aqueous solution," *J. Pharm. Sci.*, vol. 92, no. 10, 2003, doi: 10.1002/jps.10470.
 - [72] H. Nakazumi *et al.*, "Near-infrared luminescent bis-squaraine dyes linked by a thiophene or pyrene spacer for noncovalent protein labeling," in *Synthetic Metals*, 2005, vol. 153, no. 1–3, doi: 10.1016/j.synthmet.2005.07.243.
 - [73] S. Kumar, "Spectroscopy of Organic Compounds," *Dept. Chem.*, vol. 66, 2006.
 - [74] L. Karlsson, "Caries Detection Methods Based on Changes in Optical Properties between Healthy and Carious Tissue," *Int. J. Dent.*, vol. 2010, 2010, doi: 10.1155/2010/270729.
 - [75] J. R. Albani, "Absorption Spectroscopy Theory," in *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*, 2007.
 - [76] J. R. Albani, "Fluorescence Spectroscopy Principles," in *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*, 2007.
 - [77] T. B. Ren *et al.*, "A General Method to Increase Stokes Shift by Introducing Alternating Vibronic Structures," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 140, no. 24, 2018, doi: 10.1021/jacs.8b04404.
 - [78] Y. Fu and N. S. Finney, "Small-molecule fluorescent probes and their design," *RSC Advances*, vol. 8, no. 51. 2018, doi: 10.1039/c8ra02297f.
 - [79] M. A. Haidekker and E. A. Theodorakis, "Environment-sensitive behavior of fluorescent molecular rotors," *Journal of Biological Engineering*, vol. 4. 2010, doi: 10.1186/1754-1611-4-11.
 - [80] E. B. Yahya and A. M. Alqadhi, "Recent trends in cancer therapy: A review on the current state of gene delivery," *Life Sciences*, vol. 269. 2021, doi: 10.1016/j.lfs.2021.119087.
 - [81] C. Y. Zhao, R. Cheng, Z. Yang, and Z. M. Tian, "Nanotechnology for cancer therapy based on chemotherapy," *Molecules*, vol. 23, no. 4. 2018, doi: 10.3390/molecules23040826.
 - [82] L. T. Geller *et al.*, "Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine," *Science (80-.)*, vol. 357, no. 6356, 2017, doi: 10.1126/science.aah5043.
 - [83] I. Livyatan, D. Nejman, N. Shental, and R. Straussman, "Characterization of the human tumor microbiome reveals tumor-type specific intra-cellular bacteria," *Oncotmmunology*, vol. 9, no. 1. 2020, doi: 10.1080/2162402X.2020.1800957.
 - [84] U. Chilakamarthi and L. Giribabu, "Photodynamic Therapy: Past, Present and Future,"

- Chemical Record*, vol. 17, no. 8. 2017, doi: 10.1002/tcr.201600121.
- [85] J. Parrish-Novak, E. C. Holland, and J. M. Olson, "Image-guided tumor resection," *Cancer Journal (United States)*, vol. 21, no. 3. 2015, doi: 10.1097/PPO.0000000000000113.
 - [86] R. Baskar, K. A. Lee, R. Yeo, and K. W. Yeoh, "Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions," *International Journal of Medical Sciences*, vol. 9, no. 3. 2012, doi: 10.7150/ijms.3635.
 - [87] V. Dilalla, G. Chaput, T. Williams, and K. Sultanem, "Radiotherapy side effects: Integrating a survivorship clinical lens to better serve patients," *Curr. Oncol.*, vol. 27, no. 2, 2020, doi: 10.3747/co.27.6233.
 - [88] A. C. Begg, F. A. Stewart, and C. Vens, "Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs," *Nature Reviews Cancer*, vol. 11, no. 4. 2011, doi: 10.1038/nrc3007.
 - [89] A. Ashrafi *et al.*, "Current Landscape of Therapeutic Resistance in Lung Cancer and Promising Strategies to Overcome Resistance," *Cancers*, vol. 14, no. 19. 2022, doi: 10.3390/cancers14194562.
 - [90] V. Lavanya, M. Adil, N. Ahmed, A. K. Rishi, and S. Jamal, "Small molecule inhibitors as emerging cancer therapeutics," *Integr. Cancer Sci. Ther.*, vol. 1, no. 3, 2014.
 - [91] C. V. Dang, K. A. O'Donnell, K. I. Zeller, T. Nguyen, R. C. Osthus, and F. Li, "The c-Myc target gene network," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 16, no. 4. 2006, doi: 10.1016/j.semcancer.2006.07.014.
 - [92] N. Meyer and L. Z. Penn, "Reflecting on 25 years with MYC," *Nature Reviews Cancer*, vol. 8, no. 12. 2008, doi: 10.1038/nrc2231.
 - [93] H. Chen, H. Liu, and G. Qing, "Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment," *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 3, no. 1. 2018, doi: 10.1038/s41392-018-0008-7.
 - [94] S. Pelengaris, M. Khan, and G. Evan, "c-MYC: More than just a matter of life and death," *Nature Reviews Cancer*, vol. 2, no. 10. 2002, doi: 10.1038/nrc904.
 - [95] L. Soucek, S. Nasi, and G. I. Evan, "Omomyc expression in skin prevents Myc-induced papillomatosis," *Cell Death Differ.*, vol. 11, no. 9, 2004, doi: 10.1038/sj.cdd.4401443.
 - [96] D. Annibali *et al.*, "Myc inhibition is effective against glioma and reveals a role for Myc in proficient mitosis," *Nat. Commun.*, vol. 5, 2014, doi: 10.1038/ncomms5632.
 - [97] J. R. Whitfield and L. Soucek, "The long journey to bring a myc inhibitor to the clinic," *J. Cell Biol.*, vol. 220, no. 8, 2021, doi: 10.1083/jcb.202103090.
 - [98] S. Fletcher and E. V. Prochownik, "Small-molecule inhibitors of the Myc oncoprotein," *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1849, no. 5. 2015, doi: 10.1016/j.bbagr.2014.03.005.
 - [99] J. Liu *et al.*, "Precision Navigation of Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury Guided by Lysosomal Viscosity-Activatable NIR-II Fluorescence," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 144, no. 30, 2022, doi: 10.1021/jacs.2c03832.
 - [100] S. Ye, H. Zhang, J. Fei, C. H. Wolstenholme, and X. Zhang, "A General Strategy to Control Viscosity Sensitivity of Molecular Rotor-Based Fluorophores," *Angew. Chemie*, vol. 133, no. 3, 2021, doi: 10.1002/ange.202011108.

- [101] G. Gomori, "[16] Preparation of buffers for use in enzyme studies," *Methods Enzymol.*, vol. 1, no. C, 1955, doi: 10.1016/0076-6879(55)01020-3.
- [102] M. Qian *et al.*, "A mitochondria-targeting and polarity-sensitive fluorescent probe for cancer diagnosis," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 344, 2021, doi: 10.1016/j.snb.2021.130261.
- [103] Y. Wang, Y. Du, and N. Huang, "A survey of the role of nitrile groups in protein-ligand interactions," *Future Medicinal Chemistry*, vol. 10, no. 23. 2018, doi: 10.4155/fmc-2018-0252.
- [104] Y. Zhao, K. Wei, F. Kong, X. Gao, K. Xu, and B. Tang, "Dicyanoisophorone-Based Near-Infrared-Emission Fluorescent Probe for Detecting NAD(P)H in Living Cells and in Vivo," *Anal. Chem.*, vol. 91, no. 2, 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.8b03563.
- [105] M. Maiti, V. P. Murali, D. Selvakumar, A. Podder, K. K. Maiti, and S. Bhuniya, "NADH-induced 'kick-on' fluorescent probe validates crosstalk with redox regulator GSH," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 299, 2019, doi: 10.1016/j.snb.2019.126964.
- [106] P. Sun, H. Zhang, Y. Sun, and J. Liu, "The recent development of fluorescent probes for the detection of NADH and NADPH in living cells and in vivo," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 245, 2021, doi: 10.1016/j.saa.2020.118919.