

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**«Σχεδιασμός, σύνθεση και αξιολόγηση οργανικών ενώσεων με βιολογική δράση έναντι του καρκίνου και του SARS-CoV-2»**

**ΑΝΤΩΝΙΟΥ ΘΩΜΑΣ**

**ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2024**

## ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2024

Εισαγωγή στο Π.Μ.Σ. του κ. Αντωνίου Θωμά: 25-09-2021

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: Καθηγητής κος Τζάκος Ανδρέας

Θέμα: *«Σχεδιασμός, σύνθεση και αξιολόγηση οργανικών ενώσεων με βιολογική δράση έναντι του καρκίνου και του SARS-CoV-2»* .

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 1106/15-12-2023**

- 1. Τζάκος Ανδρέας**, καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
- 2. Τσίκαρης Βασίλειος**, καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
- 3. Ράμπιας Θεόδωρος**, ερευνητής Γ' βαθμίδας του Κέντρου Βασικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

**Έγκριση Μεταπτυχιακής Διατριβής στις 28-06-2024 (Βαθμός: Άριστα (10))**

---

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

---

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

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Τζάκο για την συνεργασία και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, καθώς επίσης και για την παροχή αντιδραστηρίων και εξοπλισμού με σκοπό την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στο **Ίδρυμα Μποδοσάκη**, το οποίο με χρηματοδότησε μέσω υποτροφίας, ώστε να μπορέσω να ανταπεξέλθω στις οικονομικές δυσκολίες και να φέρω εις πέρας την μεταπτυχιακή μου διατριβή. Νιώθω τεράστια υπερηφάνεια και τιμή που υπήρξα υπότροφος του εν λόγω ιδρύματος, καθώς αυτό με όπλισε με αυτοπεποίθηση και δύναμη στο να συνεχίσω να κυνηγώ τους στόχους και τα όνειρά μου.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. **Ράμπια Θεόδωρο**, αρχικά γιατί δέχτηκε να αποτελέσει μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, και κατά δεύτερον για την άψογη συνεργασία και βοήθεια που μου προσέφερε πάνω στο κεφάλαιο του SARS-CoV-2.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. **Τσίκαρη Βασίλειο**, που δέχτηκε να είναι μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, αξιολογώντας την εν λόγω διατριβή.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ερευνητική ομάδα του κ. **Σίδηρη Διαμάντη** από το Τμήμα Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, καθώς επίσης και την ερευνητική ομάδα της κ. **Naesens Lieve** από το Ινστιτούτο Rega του Πανεπιστημίου του Λουβέν στο Βέλγιο, για την πραγματοποίηση των βιολογικών πειραμάτων σχετικά με τους αναστολείς της Nsp15. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ερευνητική ομάδα του κ. **Cavalli Andrea** από το εργαστήριο Υπολογιστικής και Δομικής Βιολογίας του Institute for Research in Biomedicine στην Ελβετία για την πραγματοποίηση των πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες, μα πάνω από όλα φίλους και συνοδοιπόρους σε αυτό το ταξίδι, και συγκεκριμένα την υποψήφια διδάκτορα **Κύρκου Σταυρούλα** και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές **Μπίστα Βασίλη-Παναγιώτη**, **Νικούλη Ιωάννη** και **Φασούλη Χριστόδουλο**. Δεν είναι εύκολο να περιγράψω με λέξεις την σημασία που έχουν αυτοί οι άνθρωποι για εμένα, αλλά σίγουρα υπήρξαν στήριγμα στο να ανταπεξέλθω και να ξεπεράσω όλες τις δυσκολίες και τα προβλήματα που μου παρουσιάστηκαν. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους, Βασίλειο Γκάλπινο, Νίκο Παρίση και Βασιλική-Χαρά Αναγνώστου για την εξαιρετική συνεργασία.

Τέλος, θα ήθελα να πω ένα ξεχωριστό και τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, τους γονείς μου **Βασίλη** και **Βασιλική**, και τον αδερφό μου **Δημήτρη**, για την στήριξη και το κίνητρο που μου δίνουν σε όποιο βήμα και αν κάνω στη ζωή μου.

---

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

---

Συντμήσεις.....	7
Περίληψη.....	8
<b>Κεφάλαιο 1: Θεωρητικό μέρος.....</b>	<b>11</b>
1.1 Γενικά στοιχεία για τον καρκίνο.....	12
1.2 Χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων.....	14
1.2.1 Ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός και διατήρηση της πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης.....	15
1.2.2 Η αντίσταση σε σήματα καταστολής της ανάπτυξης.....	17
1.2.3 Αντίσταση στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.....	18
1.2.4 Η ενεργοποίηση της εισβολής και μετάστασης σε άλλους ιστούς.....	20
1.2.5 Πρόκληση αγγειογένεσης.....	22
1.2.6 Αναπαραγωγική αθανασία.....	23
1.2.7 Επαναπρογραμματισμός του ενεργειακού μεταβολισμού.....	24
1.2.8 Αστάθεια του γονιδιώματος και δημιουργία μεταλλάξεων.....	26
1.2.9 Φλεγμονές, που προωθούν την ογκογένεση.....	27
1.2.10 Ενεργοποίηση της φαινοτυπικής πλαστικότητας.....	27
1.2.11 Επιγενετικός επαναπρογραμματισμός.....	27
1.2.12 Πολυμορφικά μικροβιώματα.....	28
1.2.13 Κυτταρική γήρανση.....	29
1.3 Το μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων.....	30
1.3.1 Κύτταρα στο μικροπεριβάλλον του όγκου.....	32
1.3.2 Συνθήκες υποξίας.....	33
1.3.3 Απορρύθμιση της τιμής pH του περιβάλλοντος του όγκου.....	35
1.3.4 Φαινόμενο αυξημένης διαπερατότητας και κατακράτησης.....	35
1.3.5 Δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου.....	36
1.3.6 Υπερέκφραση ενζύμων και υποδοχέων.....	37
1.3.7 Αύξηση του ιξώδους.....	38
1.4 Διάγνωση του καρκίνου.....	39
1.4.1 Εργαστηριακές εξετάσεις.....	39



1.4.2 Τεχνικές απεικόνισης.....	40
1.4.3 Βιοψία.....	41
1.4.4 Τεχνικές απεικόνισης βασιζόμενες στον φθορισμό.....	43
1.4.5 Μηχανισμοί Φθορισμού.....	45
1.5 Θεραπεία του καρκίνου.....	45
1.5.1 Αντικαρκινικά φάρμακα.....	46
1.5.2 Στρατηγικές σύνθεσης θεραπογνωστικών ενώσεων-προφαρμάκων.....	47
1.5.3 Η δοξορουβικίνη ως αντικαρκινικό φάρμακο.....	49
<b>Κεφάλαιο 2: Πειραματικό μέρος.....</b>	<b>52</b>
Υλικά και μέθοδοι.....	53
2.1 Σχεδιασμός, σύνθεση και αξιολόγηση φθοριζουσών ενώσεων, μέσω αντιδράσεων πολλαπλών σταδίων και αντιδραστηρίων σε ένα βήμα, με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας, με σκοπό να ανταποκρίνονται στο μικροπεριβάλλον του καρκίνου.....	54
2.1.1 Ορθολογικός σχεδιασμός.....	54
2.1.2 Σύνθεση της φθορίζουσας ένωσης 2 και 3.....	56
2.1.3 Φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης 2 και 3.....	69
<b>Κεφάλαιο 3: Πειραματικό μέρος.....</b>	<b>73</b>
3.1 Σχεδιασμός, σύνθεση και αξιολόγηση μίας διαγνωστικής ένωσης, που στοχεύει και ανταποκρίνεται στο καρκινικό μικροπεριβάλλον.....	74
3.1.1 Ορθολογικός σχεδιασμός.....	74
3.1.2 Συνθετική πορεία.....	76
3.1.3 Φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης 12.....	99
3.2 Σύνθεση μιας εν δυνάμει θεραπογνωστικής ένωσης, βασισμένη στην διαγνωστική ένωση 12.....	109
3.2.1 Ορθολογικός σχεδιασμός.....	109
3.2.2 Σύνθεση της θεραπογνωστικής ένωσης 1 (TA-38 B).....	113
3.2.3 Φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης TA-38 B.....	119
3.3 Σύνοψη των αποτελεσμάτων από τη μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων των ενώσεων 12 και TA-38B.....	124
<b>Κεφάλαιο 4: Θεωρητικό μέρος.....</b>	<b>130</b>
4.1 Εισαγωγικά στοιχεία για τον SARS-CoV-2.....	131
4.2 Φυλογενετική και ταξινόμηση του ιού.....	132
4.2.1 Διαφοροποίηση του SARS-CoV-2 σε σχέση με άλλους CoVs.....	133

4.3 Δομικά χαρακτηριστικά του SARS-CoV-2.....	134
4.3.1 Γλυκοπρωτεΐνη S.....	134
4.3.2 Πρωτεΐνες Νουκλεοκαψιδίου, Μembrάνης και Περιβλήματος.....	134
4.3.3 Μη-δομικές πρωτεΐνες.....	136
4.3.4 Η μη δομική πρωτεΐνη NSP-15.....	139
4.3.5 Βοηθητικές πρωτεΐνες.....	142
4.4 Μηχανισμός μόλυνσης-Κύκλος ζωής του ιού.....	143
4.5 Διάγνωση και θεραπεία του SARS-CoV-2.....	147
<b>Κεφάλαιο 5: Πειραματικό μέρος.....</b>	
Υλικά και μέθοδοι.....	153
5.1 Σύνθεση και αξιολόγηση μικρών οργανικών μορίων, που βασίζονται στο μόριο της Ισατίνης και δρουν ως πιθανοί αναστολείς της NSP-15 του SARS-CoV-2.....	154
5.1.1 Ορθολογικός σχεδιασμός.....	154
5.1.2 Πειράματα Μοριακής Μοντελοποίησης.....	156
5.1.3 Γενική συνθετική πορεία των αναλόγων της Ισατίνης, στα οποία έχει ενσωματωθεί η νιτριλο-ομάδα.....	161
5.1.4 Σύνθεση των ενώσεων 14-18.....	165
5.1.5 Βιολογική αξιολόγηση των πέντε πρόδρομων αναλόγων της Ισατίνης και των πέντε νέων μορίων, μετά την ενσωμάτωση της νιτριλο-ομάδας, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν την Nsp15.....	177
5.2 Σύνθεση μιας δεύτερης γενιάς πιθανών αναστολέων της πρωτεΐνης Nsp15.....	184
5.2.1 Ορθολογικός σχεδιασμός.....	184
5.2.2 Σύνθεση αναλόγων της Ροδανίνης.....	185
5.2.3 Μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων των αναλόγων της ροδανίνης.....	201
5.2.4 Βιολογική αξιολόγηση των αναλόγων της ροδανίνης ως προς την ικανότητά τους να δρουν εναντίον του ιού SARS-CoV-2, αναστέλλοντας την πρωτεΐνη Nsp15.....	203
<b>Παράρτημα.....</b>	<b>208</b>
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>210</b>

---

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

---

Συντμήσεις	Όνομα στην Ελληνική
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
Bw, Bandwidth	Εύρος ζώνης
$\text{CDCl}_3$	Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DMF	N,N-Διμεθυλοφορμαμίδιο
Doxorubicin, Dox	Δοξορουβικίνη
Excitation	Διέγερση
Emission	Εκπομπή
eq, equivalent	Ισοδύναμα
FRET	Μεταφορά ενέργειας συντονισμού φθορισμού
GF	Παράγοντας ανάπτυξης
HCl	Υδροχλωρικό οξύ
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης
ICT	Ενδομοριακή μεταφορά φορτίου
MeOH	Μεθανόλη
$\text{N}_2$	Άζωτο
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	Θεικό νάτριο
NIR	Εγγύς υπέρυθρο
NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
PBS	Αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα
ROS	Δραστικές ρίζες οξυγόνου
rt	Θερμοκρασία δωματίου
Silica gel	Πυριτική γέλη
TFA	Τριφθοροοξικό οξύ
TLC	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

---

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ-ΣΚΟΠΟΣ

---

Η εν λόγω μεταπτυχιακή διατριβή κυμαίνεται σε δύο βασικούς άξονες, στοχεύοντας δύο ασθένειες, οι οποίες απασχολούν τον ανθρώπινο πληθυσμό. Η μία είναι ο καρκίνος, ο οποίος ακόμα και στη σημερινή εποχή, αποτελεί την δεύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως, πίσω μόνο από τις καρδιαγγειακές παθήσεις, και η δεύτερη είναι η COVID-19, μία ασθένεια πρόσφατη, που εξελίχθηκε σε παγκόσμια πανδημία με ανυπολόγιστες συνέπειες για τον πλανήτη.

Σχετικά με τον καρκίνο, λαμβάνοντας υπόψη τα μειονεκτήματα των περισσότερων χημειοθεραπειών, όπως η μη εκλεκτικότητα, οι παρενέργειες και η αντίσταση στο φάρμακο, είναι πλέον αδήριτη ανάγκη για εύρεση νέων μεθόδων διάγνωσης και θεραπείας. Η στοχευμένη θεραπεία έγκειται στην ανάπτυξη θεραπογνωστικών μορίων, τα οποία φέρουν έναν παράγοντα απεικόνισης (μία φθορίζουσα), ο οποίος ανιχνεύει τα καρκινικά κύτταρα και έναν κυτταροτοξικό παράγοντα. Η ανίχνευση καρκινικών κυττάρων, μέσω του φθορισμού είναι μια αρκετά σύγχρονη και καινοτόμα μέθοδος και για αυτόν τον λόγο, στα πλαίσια αυτής της διατριβής πραγματοποιήθηκε η σύνθεση και η αξιολόγηση ενός νέου χρωμοφόρου πυρήνα, μέσω πολυσυστατικών αντιδράσεων, με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας, το οποίο με περαιτέρω τροποποιήσεις θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό εργαλείο. Επιπρόσθετα, αναπτύχθηκε ένα καινοτόμο προφάρμακο της δοξορουβικίνης, το οποίο μπορεί να δράσει και ως μέσο ανίχνευσης του όγκου. Το μόριο αυτό αποτελείται από μία χρωστική που φθορίζει στο εγγύς υπέρυθρο και ανταποκρίνεται εκλεκτικά στις διαφοροποιημένες ιδιότητες του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος (pH, ιξώδες). Η χρωστική συνδέεται μέσω ενός συνδέτη με τον κυτταροτοξικό παράγοντα, δοξορουβικίνη, η οποία μεταφέρει ενέργεια στη χρωστική μέσω του φαινομένου FRET. Ο συνδέτης διασπάται εκλεκτικά από ένζυμα που υπερεκφράζονται στο καρκινικό περιβάλλον και έτσι η απελευθέρωση της δοξορουβικίνης γίνεται στοχευμένα στον όγκο. Ταυτόχρονα, το φαινόμενο FRET διακόπτεται, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την παρακολούθηση της απελευθέρωσης του φαρμάκου σε πραγματικό χρόνο, μέσω μελέτης φθορισμού.

Στο δεύτερο κεφάλαιο αυτής της διατριβής, επικεντρωθήκαμε στον ιό SARS-CoV-2, η έξαρση του οποίου έχει προκαλέσει παγκόσμια υγειονομική και οικονομική κρίση, κάνοντας την ανάπτυξη αντικών φαρμάκων απολύτως απαραίτητη. Η Nsp15, μια μη δομική ενδοριβονουκλεάση, η οποία εξειδικεύεται στην αναγνώριση ουριδίνης, διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αντιγραφή του ιού και την αποφυγή του από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, γεγονός που την καθιστά αυτόματα έναν πολλά υποσχόμενο στόχο για την καταπολέμηση του ιού. Με άξονα αυτό, εστίασαμε την προσοχή μας στην σύνθεση μορίων, τα οποία αναστέλλουν τη δράση της Nsp15. Με πειράματα μοριακής μοντελοποίησης ταυτοποιήσαμε δύο κατηγορίες ετεροκυκλικών ενώσεων (ανάλογα Ισατίνης και Ροδανίνης), ως πιθανούς αναστολείς, και προχωρήσαμε στην τροποποίησή τους με χρήση γρήγορων συνθετικών πρωτοκόλλων, υψηλών αποδόσεων. Με κατάλληλα βιολογικά πειράματα αποδείχθηκε πως οι ενώσεις αυτές διαθέτουν δυναμικό αναστολής, της τάξης μερικών  $\mu\text{M}$ , έναντι της Nsp15 και ταυτόχρονα καμία τοξικότητα στις θεραπευτικά καθορισμένες δόσεις. Μάλιστα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε μία από τις ενώσεις αυτές, αφού κατάφερε να μειώσει το ιικό φορτίο κατά 68.000 φορές.

---

## *ABSTRACT*

---

This master's thesis revolves around two main diseases that have a major impact on human population. First is cancer, which is still the second leading cause of mortality globally. The other is COVID-19, a relatively new disease that has spread over the world and become a pandemic with unimaginable effects on the planet.

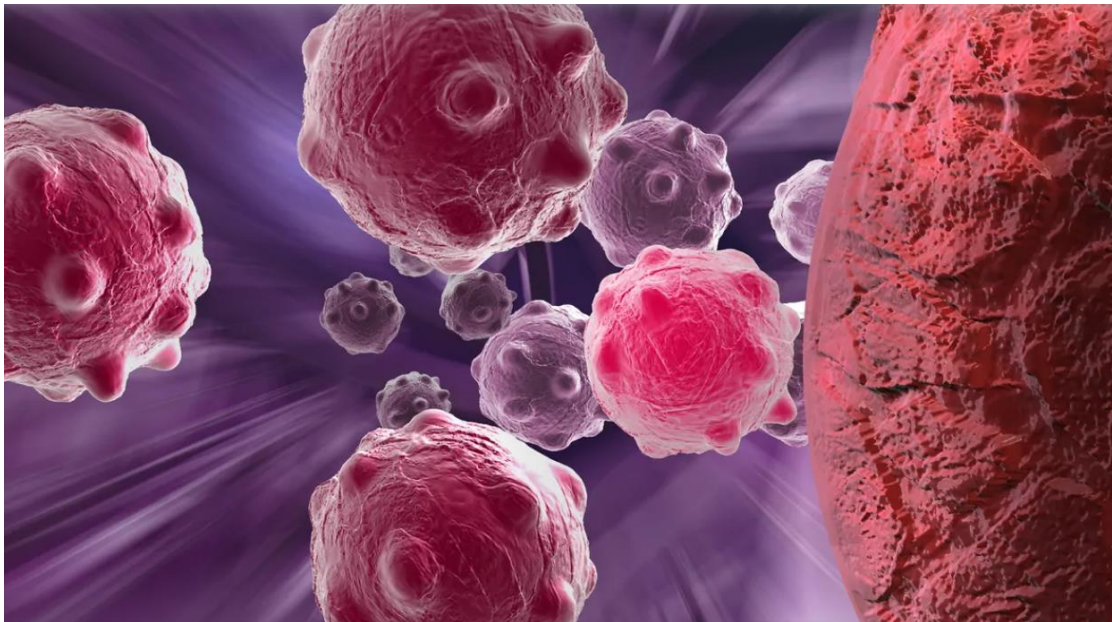
In the case of cancer, there is an unmet need for development of novel therapeutic and diagnostic approaches, considering the limitations of the majority of chemotherapies, including non-selectivity, side effects, and drug resistance. The synthesis of theranostic molecules, which contain a cytotoxic drug and an imaging agent, that can identify cancer cells, is a crucial part of targeted therapies. Fluorescence-based cancer cell detection is an extremely modern and cutting-edge technique. Thus, at first step we synthesized a novel chromophore scaffold through multicomponent reactions, that with further modifications could be utilized as a diagnostic tool. Furthermore, a novel theranostic prodrug of Doxorubicin was developed, which consists of a near-infrared fluorescent dye that is responsive to cancer microenvironment's distinct characteristics (pH, viscosity). The cytotoxic agent is connected to the dye with a linker, that is selectively cleaved in cancerous environment. The innovative part of this theranostic molecule is that Doxorubicin can interact with the dye through FRET phenomenon. This phenomenon is disrupted when the cleavage took place, and this can be further utilized for real-time monitoring of drug release through fluorescent studies.

The SARS-CoV-2 virus, whose spread led to a global health and economic crisis and made the development of antiviral medications vital, is the subject of this thesis' second chapter. Targeting Nsp15, a non-structural endoribonuclease with expertise in uridine recognition, is a highly promising strategy to attack the virus because this protein is essential to the virus's replication and ability to evade the host's immune system. In light of this, we concentrated on synthesizing compounds that could prevent the activity of Nsp15. We proceeded with the modification of two types of heterocyclic compounds (Isatin and Rhodanine analogues) utilizing fast synthetic protocols with high yields, after identifying them as potent inhibitors through molecular modeling studies. The biological evaluation indicated that these compounds exhibited inhibitory activity, at micromolar range, against this protein, while did not display any toxicity at therapeutically defined concentrations. One of these compounds stood out in particular because it was able to reduce the viral load by a factor of 68,000.



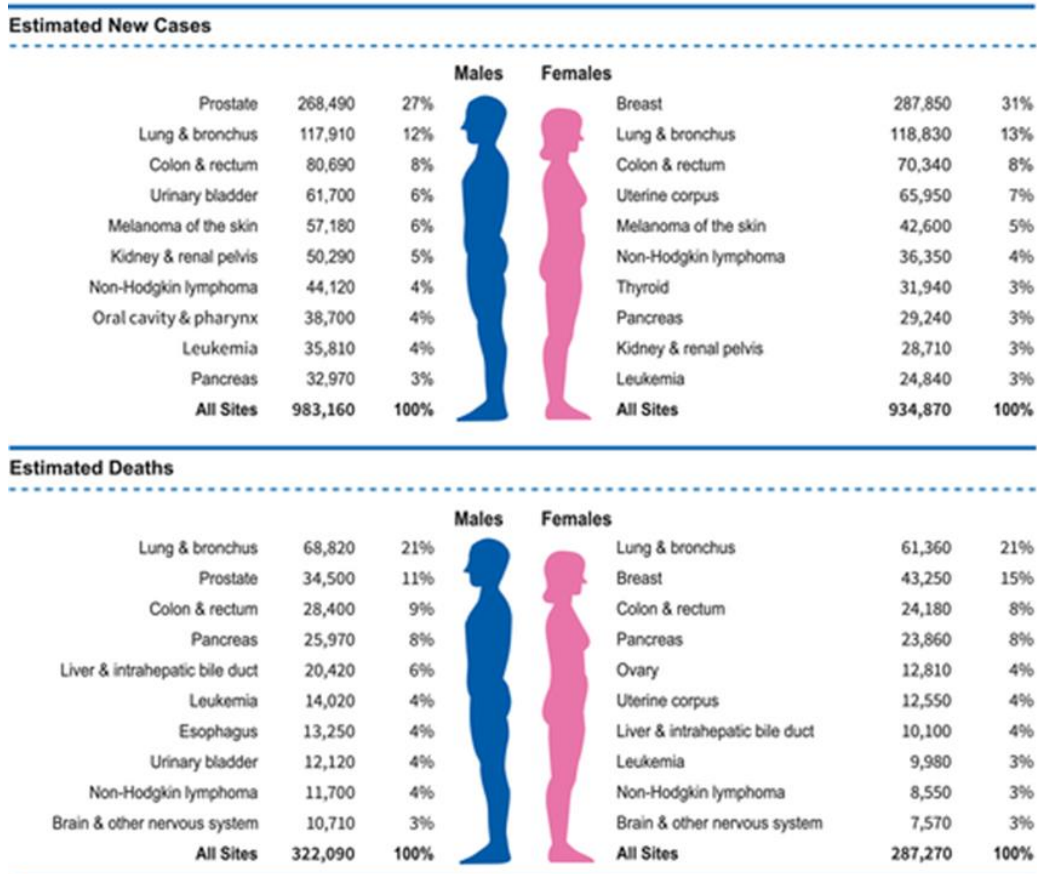
# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

**Στοιχεία για τον καρκίνο και το μικροπεριβάλλον  
των καρκινικών κυττάρων**



## 1.1 Γενικά στοιχεία για τον Καρκίνο

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις πιο κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως, απειλώντας και πλήττοντας την υγεία των ανθρώπων και όχι μόνο. Αποτελεί κέντρο ενδιαφέροντος της επιστημονικής κοινότητας πολλά χρόνια τώρα, γιατί παρόλο που είναι ασθένεια γνωστή από την αρχαιότητα δεν έχει καταστεί ακόμη πλήρως κατανοητή. Ακόμα και σήμερα, παρόλη την πρόοδο στις επιστήμες της υγείας και της τεχνολογίας, ο καρκίνος παραμένει η δεύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως, πίσω μόνο από τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Ο αριθμός των περιπτώσεων καρκίνου ολοένα και αυξάνεται με την αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού. Αρκεί να αναφερθεί πως σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO), μόνο για το έτος 2022 στις Ηνωμένες Πολιτείες, έχουν καταγραφεί 1.918.030 περιστατικά της νόσου και 609.360 θάνατοι, ενώ στον παγκόσμιο πληθυσμό τα περιστατικά ανέρχονται κοντά στα 20 εκατομμύρια. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει τη σοβαρότητα της εν λόγω νόσου. Οι πιο συνηθισμένοι τύποι καρκίνου για το 2022 ήταν ο καρκίνος του πνεύμονα, ο καρκίνος του μαστού, ο καρκίνος του παχέος εντέρου, ο καρκίνος του προστάτη και ο καρκίνος του στομάχου. Ωστόσο, οι συγκεκριμένοι τύποι καρκίνου, που ευθύνονται για την πλειονότητα των θανάτων, διέφεραν ανάλογα με την περιοχή και τον πληθυσμό. Τα παραπάνω στατιστικά στοιχεία συνοψίζονται στην ακόλουθη **Εικόνα 1**. [1]



**Εικόνα 1.** Οι δέκα πιο συνηθισμένοι και θανατηφόροι τύποι καρκίνου κατηγοριοποιημένοι ανά φύλο, στις Η.Π.Α, για το έτος 2022. [1]





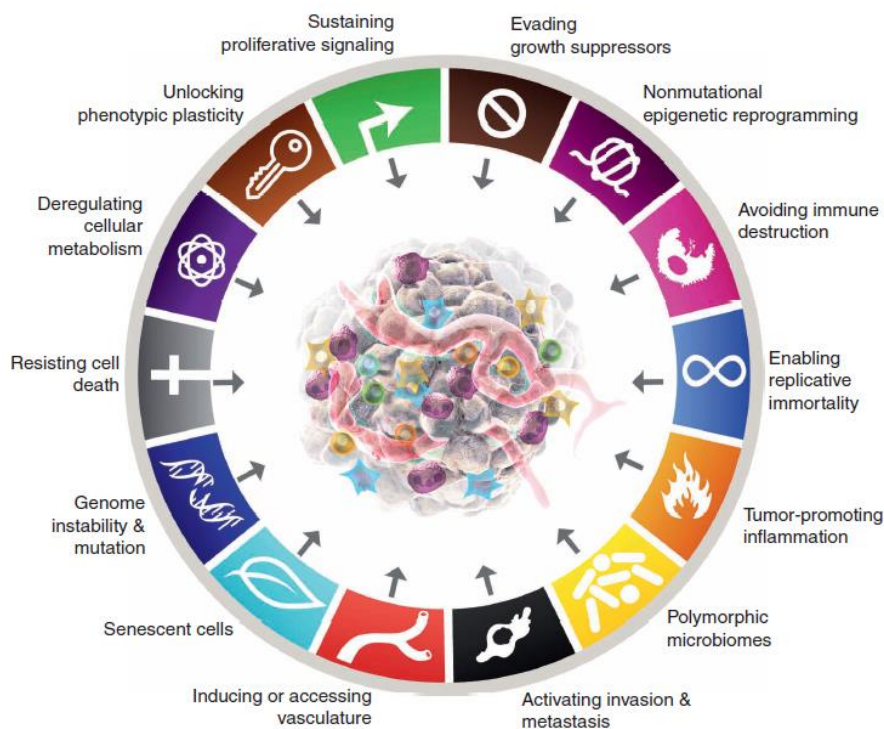
γειτονικούς ιστούς, και σε κακοήθη, που έχει την ικανότητα της μετάστασης, δηλαδή να επεκτείνεται στο σώμα, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή του λεμφικού συστήματος. Οι περισσότερες μορφές καρκίνου ταξινομούνται στις παρακάτω κατηγορίες: 1) Στα καρκινώματα, στα οποία περιλαμβάνεται το 90% των ανθρώπινων καρκίνων, και είναι όγκοι επιθηλιακών κυττάρων, 2) Στα σαρκώματα, τα οποία είναι συμπαγείς όγκοι συνδετικού ιστού των μυών, χόνδρων και ινωδών ιστών, 3) Στις λευχαιμίες και τα λεμφώματα, που προέρχονται από κύτταρα του αίματος ή του ανοσοποιητικού αντιστοίχως.

Επειδή λοιπόν, ο καρκίνος αποτελεί μία πολυσύνθετη και πολύπλοκη ασθένεια, είναι μεγίστης σημασίας η διερεύνηση και κατανόηση του τρόπου συμπεριφοράς και δράσης των καρκινικών κυττάρων, ώστε να σχεδιαστεί ένας ορθολογικός τρόπος αντιμετώπισης της νόσου αυτής. Αρκετές επιστημονικές ομάδες, βασιζόμενες στις αρχές της κυτταρικής βιολογίας, έχουν προσπαθήσει από τις αρχές του 21<sup>ου</sup> αιώνα να κατανοήσουν και να ομαδοποιήσουν τα χαρακτηριστικά των κυττάρων, που ωθούν σε παρεκκλίνουσα συμπεριφορά και εν τέλει σε ανάπτυξη όγκων.

## 1.2 Χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων

Τα γενικά χαρακτηριστικά που έχουν επισημάνει οι επιστήμονες μέχρι σήμερα, τα οποία διέπουν τα καρκινικά κύτταρα και τα διαφοροποιούν από τα φυσιολογικά, παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3**, και είναι τα εξής:

- 1) Ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός, λόγω της ικανότητας διατήρησης της πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης
- 2) Η αντίσταση σε σήματα, που προάγουν την καταστολή της ανάπτυξης
- 3) Η αντίσταση στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο
- 4) Η ενεργοποίηση των διαδικασιών της εισβολής και μετάστασης σε άλλους ιστούς
- 5) Η πρόκληση αγγειογένεσης
- 6) Η αναπαραγωγική αθανασία
- 7) Ο επαναπρογραμματισμός του ενεργειακού μεταβολισμού των κυττάρων
- 8) Η αποφυγή της καταστολής από το ανοσοποιητικό σύστημα
- 9) Η αστάθεια του γονιδιώματος και η δημιουργία μεταλλάξεων
- 10) Ύπαρξη φλεγμονών, που προάγουν την ογκογένεση
- 11) Η ενεργοποίηση της φαινοτυπικής πλαστικότητας
- 12) Ο επιγενετικός επαναπρογραμματισμός, ανεξάρτητος μεταλλάξεων
- 13) Τα πολυμορφικά μικροβιώματα
- 14) Η κυτταρική γήρανση



*Εικόνα 3. Τα βασικά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων, τα οποία συναντώνται στην πλειοψηφία των κακοηθών όγκων, όπως έχουν καταγραφεί μέχρι το 2022. [3]*

### **1.2.1 Ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός και διατήρηση της πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης**

Αναμφισβήτητα το πιο θεμελιώδες χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων περιλαμβάνει την ικανότητά τους να διατηρούν τον χρόνιο και ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Καταρχάς, αξίζει να διευκρινιστεί πως τα φυσιολογικά κύτταρα, για να μεταβούν από μια κατάσταση ηρεμίας σε μία πολλαπλασιαστική φάση, είναι αναγκαία η παραγωγή κάποιων μιτογόνων σημάτων, που προάγουν την ανάπτυξη και κυτταρική διαίρεση. Αυτά τα σήματα μεταδίδονται στο κύτταρο μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων, που μπορεί να περιλαμβάνουν αυξητικούς παράγοντες, συστατικά της εξωκυτταρικής μήτρας και μόρια προσκόλλησης/αλληλεπίδρασης ενός κυττάρου με ένα άλλο. Πιο συγκεκριμένα, οι αυξητικοί παράγοντες δεσμεύουν τους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας (περιοχές τυροσινικών κινασών), οι οποίοι με την σειρά τους εκπέμπουν σήματα, μέσω διακλαδισμένων ενδοκυτταρικών οδών παρακρινούς σηματοδότησης, που ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη. Συχνά αυτά τα σήματα επηρεάζουν άλλες κυτταρικές-βιολογικές διεργασίες, όπως η κυτταρική επιβίωση και ο ενεργειακός μεταβολισμός. Ακόμα, η βιοδιαθεσιμότητα των αυξητικών παραγόντων ρυθμίζεται και από την δράση διάφορων πρωτεασών και ενζύμων. [3], [4] Επιπρόσθετα, σε έναν φυσιολογικό ιστό υφίσταται αυστηρός και προσεκτικός έλεγχος της παραγωγής και απελευθέρωσης τέτοιων σημάτων, που καθοδηγούν τον κύκλο διαίρεσης και ανάπτυξης των κυττάρων, με απώτερο σκοπό να διασφαλίζεται η ομοιοστάση του αριθμού των κυττάρων και κατ' επέκταση να διατηρείται η αρχιτεκτονική και λειτουργία του ιστού. [5], [6]

Αυτή η συμπεριφορά έρχεται σε αντίθεση με εκείνη των καρκινικών κυττάρων, τα οποία είτε παράγουν πολλά από τα δικά τους σήματα ανάπτυξης, μειώνοντας έτσι την εξάρτησή τους από εξωγενή σήματα διέγερσης, είτε απορρυθμίζουν σε κάποια σημεία τον έλεγχο της

παραγωγής τέτοιων σημάτων, και έτσι κατά κάποιον τρόπο ελέγχουν τα ίδια την εξέλιξή τους. Τα καρκινικά κύτταρα, λοιπόν, διαθέτουν εναλλακτικούς τρόπους για να διατηρούν αυτάρκεια σε σήματα ανάπτυξης και συνεπώς, πολλαπλασιαστική σηματοδότηση.

Ένας πρώτος τρόπος περιλαμβάνει τα σήματα εξωκυτταρικής ανάπτυξης. Ειδικότερα, ενώ οι περισσότεροι αυξητικοί παράγοντες (Growth Factors, GF) παράγονται από έναν τύπο κυττάρου για να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό ενός άλλου (ετεροτυπική σηματοδότηση), πολλά καρκινικά κύτταρα αποκτούν την ικανότητα να συνθέτουν GFs στους οποίους και αποκρίνονται μέσω της έκφρασης συγγενών υποδοχέων, με αποτέλεσμα αυτοκρινή πολλαπλασιαστική διέγερση. Δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων παραγόντων είναι, ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF) και ο παράγοντας αύξησης του όγκου (TGF- $\alpha$ ).

Ένας δεύτερος τρόπος, σχετίζεται με τους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, που μεταφέρουν σήματα διέγερσης της ανάπτυξης στο εσωτερικό του κυττάρου. Οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων συχνά υπερεκφράζονται σε ποικίλους τύπους καρκίνου. Η σηματοδότηση του υποδοχέα μπορεί επίσης να απορυθμιστεί με την υπερέκφραση των πρωτεϊνών του υποδοχέα, που εμφανίζονται στην επιφάνεια του καρκινικού κυττάρου, καθιστώντας τέτοια κύτταρα υπερανταποκρινόμενα σε κάποιον αυξητικό παράγοντα.

Ένας επιπλέον τρόπος δράσης των καρκινικών κυττάρων, για να διατηρήσουν τον πολλαπλασιασμό τους, αφορά την “στρατολόγηση” φυσιολογικών κυττάρων για να ενισχύσουν το δυναμικό ανάπτυξης όγκου, μέσω παρακρινούς σηματοδότησης. Πιο απλά, τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να στείλουν σήματα για τη διέγερση των φυσιολογικών κυττάρων, που βρίσκονται στο ίδιο στρώμα με αυτά, και τα τελευταία με τη σειρά τους να συνεργάζονται και να ανταποκρίνονται, τροφοδοτώντας τα καρκινικά κύτταρα με διάφορους αυξητικούς παράγοντες. [3]

Τέλος, ο πιο περίπλοκος μηχανισμός διατήρησης της αυτονομίας και ανεξαρτησίας των καρκινικών κυττάρων σε σήματα ενεργοποίησης της ανάπτυξης, εμπεριέχει τροποποιήσεις σε σηματοδοτικά μονοπάτια, που λειτουργούν καθοδικά του σταδίου ενεργοποίησης του υποδοχέα, από έναν προσδέτη ή κάποιο εξωκυτταρικό μοριακό σήμα. Συγκεκριμένα, στα φυσιολογικά κύτταρα, τα μονοπάτια αυτά ενεργοποιούνται, μέσω ενός σηματοδοτικού “βιοχημικού καταρράκτη”, αφού προηγηθεί η ενεργοποίηση του υποδοχέα. Στον αντίποδα, στα καρκινικά κύτταρα συμβαίνει ενεργοποίηση ορισμένων συστατικών αυτών των οδών σηματοδότησης, παρακάμπτοντας στην ουσία την ανάγκη διέγερσης αυτών των οδών μέσω ενεργοποίησης υποδοχέα. Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί πως πρόσφατες μελέτες έδειξαν, ότι ακόμα και διάφορες σωματικές μεταλλάξεις ενδέχεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε μονοπάτια, που σχετίζονται με την πολλαπλασιαστική σηματοδότηση. Για παράδειγμα, διαταραχή σε μια πορεία, που αρχικά λειτουργεί ως εμπόδιο του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού, μπορεί εν τέλει να προκαλέσει αντίθετα αποτελέσματα. Τέτοιες μεταλλάξεις είναι αυτές που για παράδειγμα, ευθύνονται για τις ογκογόνες ιδιότητες της πρωτεΐνης Ras ή την απώλεια λειτουργίας της φωσφατάσης PTEN, η οποία εξουδετερώνει την PI3-κίνηση αποικοδομώντας το προϊόν της, την τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνositόλη (3,4,5) (PIP3). Οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας στο PTEN ενισχύουν τη σηματοδότηση PI3K και προάγουν την ογκογένεση.

Συνοψίζοντας, με όσα προαναφέρθηκαν συνειδητοποιούμε πως ο χρόνιος πολλαπλασιασμός είναι ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων.

### 1.2.2 Η αντίσταση σε σήματα καταστολής της ανάπτυξης

Σε έναν φυσιολογικό ιστό, αρκετά σήματα, που καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό, λειτουργούν, με σκοπό τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών. Αυτά τα σήματα αναστολής της ανάπτυξης λαμβάνονται από διαμεμβρανικούς υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, οι οποίοι είναι συζευγμένοι με ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Τα σήματα κατά της ανάπτυξης μπορούν να εμποδίσουν τον πολλαπλασιασμό με δύο διαφορετικούς μηχανισμούς. Τα κύτταρα μπορεί να αναγκαστούν να εξέλθουν από τον ενεργό πολλαπλασιαστικό κύκλο και να εισέλθουν στην κατάσταση ηρεμίας ( $G_0$ ), από την οποία μπορεί να επανεμφανιστούν σε κάποια μελλοντική περίπτωση, όταν τα εξωκυτταρικά σήματα το επιτρέπουν. Εναλλακτικά, τα κύτταρα μπορεί να κληθούν να εγκαταλείψουν οριστικά το πολλαπλασιαστικό τους δυναμικό, ώστε να εισέλθουν σε μεταμιτωτικές καταστάσεις, που συνήθως συνδέονται με την απόκτηση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση. Τα καρκινικά κύτταρα, λοιπόν, πρέπει να παρακάμπτουν τα σήματα που ρυθμίζουν αρνητικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τους. [3]

Πολλά από τα σήματα αυτά εξαρτώνται από τις δράσεις των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Έχουν ανακαλυφθεί δεκάδες ογκοκατασταλτικά γονίδια, που λειτουργούν με διάφορους τρόπους, για να περιορίσουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Πολλά από τα σήματα καταστολής του πολλαπλασιασμού συσχετίζονται με δύο ογκοκατασταλτικά γονίδια, την πρωτεΐνη Rb και την πρωτεΐνη TP53, οι οποίες με τη σειρά τους κατέχουν μια εξέχουσα θέση “ελεγκτή” των σηματοδοτικών οδών, που καθορίζουν αν το κύτταρο θα πολλαπλασιαστεί ή θα οδηγηθεί σε γήρανση και απόπτωση. Η πρωτεΐνη που σχετίζεται με το ρετινοβλάστωμα, Rb, αποτρέπει την υπερβολική κυτταρική ανάπτυξη, αναστέλλοντας την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου έως ότου ένα κύτταρο είναι έτοιμο να διαιρεθεί. Όταν το κύτταρο είναι έτοιμο να διαιρεθεί, η pRb φωσφορυλιώνεται, με αποτέλεσμα να απενεργοποιείται, και έτσι ο κυτταρικός κύκλος αφήνεται να προχωρήσει. Επιπλέον, η pRb αποτρέπει την πρόοδο από τη φάση G1 στη φάση S του κύκλου διαίρεσης των κυττάρων, είτε περιορίζοντας την αντιγραφή του DNA, είτε αναστέλλοντας μεταγραφικούς παράγοντες, που ωθούν το κύτταρο στη φάση S. Η φωσφορυλίωση της pRb ελέγχεται και αναστέλλεται από έναν ακόμη σηματοδοτικό παράγοντα, τον TGF- $\beta$ . Η διαταραχή του TGF- $\beta$  επιτρέπει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθιστώντας τα κύτταρα μη ευαίσθητα σε αντιαναπτυξιακούς παράγοντες. Αντίστοιχα, το ογκοκατασταλτικό p53 διαδραματίζει ρόλο στη ρύθμιση ή την ανάπτυξη μέσω του κυτταρικού κύκλου, στη γονιδιωματική σταθερότητα και την απόπτωση (εάν οι συνθήκες διαβίωσης του κυττάρου είναι απαγορευτικές), μέσω πολλών μηχανισμών. Σε πολλούς τύπους καρκίνων, αυτό το γονίδιο είναι μεταλλαγμένο και ως αποτέλεσμα αυτά τα καρκινικά κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα. [7]

Τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν διάφορες στρατηγικές για να αποφύγουν και την διαδικασία της διαφοροποίησης. Μια στρατηγική για την αποφυγή της διαφοροποίησης περιλαμβάνει το ογκογονίδιο *c-myc*, το οποίο κωδικοποιεί έναν παράγοντα μεταγραφής. Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης, η διεγερτική δράση του συμπλόκου Myc-Max, μπορεί να αντικατασταθεί από μια ομάδα μεταγραφικών παραγόντων Mad. Τα σύμπλοκα Mad-Max παράγουν σήματα, που προκαλούν διαφοροποίηση. Ωστόσο, η υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης c-Myc στην περίπτωση του καρκίνου, μπορεί να αναστρέψει αυτή τη διαδικασία, μετατοπίζοντας την ισορροπία προς όφελος των συμπλεγμάτων Myc-Max, μειώνοντας έτσι τη διαφοροποίηση και προάγοντας την ανάπτυξη. [8]

Συνοψίζοντας, σε πολλούς τύπους καρκίνου έχει διαπιστωθεί, πως η λειτουργία πολλών ογκοκατασταλτικών γονιδίων έχει χαθεί, με αποτέλεσμα τα καρκινικά κύτταρα να εμφανίζουν αντίσταση σε σήματα που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό.

### 1.2.3 Αντίσταση στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο

Ένα ακόμα χαρακτηριστικό, που διαφοροποιεί τα φυσιολογικά με τα καρκινικά κύτταρα, είναι η αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (Programmed Cell Death, PCD), που αναφέρεται στην απόπτωση, στην αυτοφαγία και στην προγραμματισμένη νέκρωση, είναι ο θάνατος ενός κυττάρου σε οποιαδήποτε παθολογική μορφή, και μεσολαβείται από έναν ενδοκυτταρικό μηχανισμό. Η απόπτωση υφίσταται σε όλους σχεδόν τους τύπους κυττάρων ως ένας μηχανισμός σε λανθάνουσα μορφή και αναμένει να ενεργοποιηθεί από συγκεκριμένα ερεθίσματα. Ο αποπτωτικός μηχανισμός συνίσταται από δύο είδη μορίων, τους αισθητήρες και τους τελεστές. Οι αισθητήρες είναι υπεύθυνοι για την παρακολούθηση των συνθηκών, κανονικότητας ή ανωμαλίας, του εξωκυτταρικού και ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος και επηρεάζουν αν ένα κύτταρο πρέπει να επιβιώσει ή να καταστραφεί. Αυτά τα σήματα ρυθμίζουν τη δεύτερη κατηγορία συστατικών, τα οποία λειτουργούν ως τελεστές της απόπτωσης. Οι ενδοκυτταρικοί αισθητήρες παρακολουθούν την λειτουργικότητα του κυττάρου και ενεργοποιούν το μονοπάτι της απόπτωσης ως απόκριση στην ανίχνευση ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένης της βλάβης του DNA, της ανισορροπίας στη σηματοδότηση, που προκαλείται από τη δράση ογκογονιδίων, της κατάργησης σημάτων επιβίωσης, της ανεπάρκειας παραγόντων επιβίωσης ή της υποξίας. Πολλά από τα σήματα που προκαλούν απόπτωση συγκλίνουν στα μιτοχόνδρια, τα οποία ανταποκρίνονται στα προαποπτωτικά σήματα απελευθερώνοντας το κυτόχρωμα C, έναν ισχυρό καταλύτη της απόπτωσης. Αναλυτικότερα, τα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2, έχουν είτε προαποπτωτική (Bax, Bak, Bid, Bim) είτε αντιαποπτωτική (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W) δράση. Οι δύο προαποπτωτικές πρωτεΐνες ενεργοποίησης (Bax και Bak) είναι ενσωματωμένες στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Όταν δεν αναστέλλονται από τους αντιαποπτωτικούς συγγενείς τους, οι πρωτεΐνες Bax και Bak διαταράσσουν την ακεραιότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, προκαλώντας την απελευθέρωση προαποπτωτικών πρωτεϊνών σηματοδότησης, η πιο σημαντική από τις οποίες είναι το κυτόχρωμα C. Το απελευθερωμένο κυτόχρωμα C ενεργοποιεί, με τη σειρά του, έναν καταρράκτη ενδοκυτταρικών πρωτεασών, των κασπασών (κασπάσες 8 και 9), που δρουν μέσω των πρωτεολυτικών δραστηριοτήτων τους, για να επάγουν τις πολλαπλές κυτταρικές αλλαγές που σχετίζονται με την απόπτωση, και περιλαμβάνουν τη διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και του κυτταροπλασματικού και πυρηνικού σκελετού, την αποικοδόμηση των χρωμοσωμάτων, τον κατακερματισμό του πυρήνα και εν τέλει τη φαγοκύτωση των υπολειμμάτων του κυττάρου από τα φαγοκύτταρα. [9]

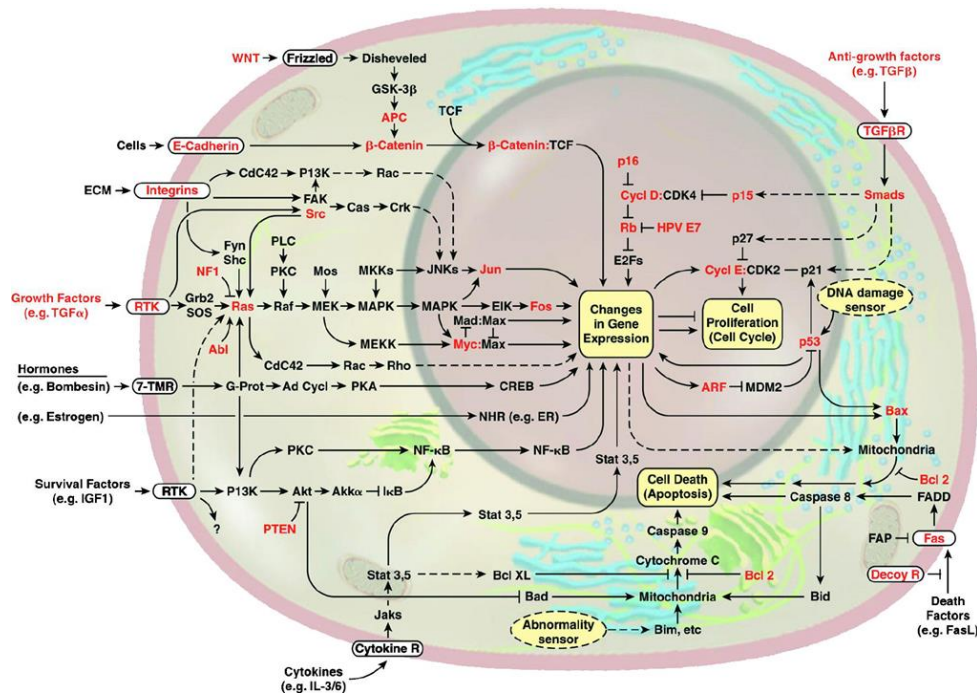
Αντίσταση στην απόπτωση μπορεί να αποκτηθεί από τα καρκινικά κύτταρα μέσω μιας πληθώρας διεργασιών. Σίγουρα, η πιο συχνά εμφανιζόμενη διεργασία σχετίζεται με την απώλεια ενός προαποπτωτικού ρυθμιστή, μέσω μετάλλαξης, και περιλαμβάνει το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αφαίρεση της λειτουργίας ενός βασικού συστατικού του αισθητήρα βλάβης DNA, που μπορεί να ενεργοποιήσει τον σηματοδοτικό καταρράκτη της απόπτωσης. Εναλλακτικά, τα καρκινικά κύτταρα δύνανται να επιτύχουν παρόμοια παράκαμψη της απόπτωσης, αυξάνοντας την έκφραση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών (Bcl-2, Bcl-xL) ή μειώνοντας την έκφραση των προαποπτωτικών παραγόντων (Bax, Bim, Puma). Επιπλέον, το σηματοδοτικό μονοπάτι κινάσης PI3-AKT/PKB,

το οποίο μεταδίδει αντιαποπτωτικά σήματα επιβίωσης, πιθανότατα εμπλέκεται στην αποφυγή της απόπτωσης.

Ένας άλλος μηχανισμός που αναφέρθηκε είναι η αυτοφαγία, η οποία επιτρέπει στα κύτταρα να διασπούν κυτταρικά οργανίδια, όπως τα ριβοσώματα και τα μιτοχόνδρια, επιτρέποντας στους καταβολίτες, που προκύπτουν, να ανακυκλωθούν και να χρησιμοποιηθούν στο πλαίσιο βιοσύνθεσης και μεταβολισμού ενέργειας. Ως μέρος αυτής της διαδικασίας, τα ενδοκυτταρικά κυστίδια, που ονομάζονται αυτοφαγοσώματα περιβάλλουν τα ενδοκυτταρικά οργανίδια και στη συνέχεια συντήκονται με λυσοσώματα, όπου λαμβάνει χώρα αποικοδόμηση. Με αυτόν τον τρόπο, παράγονται μεταβολίτες χαμηλού μοριακού βάρους, που υποστηρίζουν την επιβίωση στα, περιορισμένα σε θρεπτικά συστατικά, περιβάλλοντα, που συναντώνται πολλά καρκινικά κύτταρα. Η αυτοφαγία μπορεί να μεσολαβεί τόσο στην επιβίωσή τους, αλλά ταυτόχρονα να αποτελεί ένα εμπόδιο της ογκογένεσης. Για παράδειγμα, η οδός σηματοδότησης PI3K/AKT/mTOR, μπορεί να εμφανίσει διττό ρόλο, καθώς όταν διεγερθεί από σήματα που προάγουν την επιβίωση του κυττάρου, αναστέλλει την αυτοφαγία, ενώ όταν ρυθμίζεται αρνητικά την προάγει. [10]

Ο τελευταίος μηχανισμός, που εμπεριέχεται στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, είναι η νέκρωση. Με τον νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο, γίνεται διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης και απελευθέρωση του εσωτερικού των κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του ιστού. Επίσης, σε αντίθεση με τις διαδικασίες της απόπτωσης και της αυτοφαγίας, εδώ συμβαίνει απελευθέρωση προφλεγμονωδών σημάτων στο περιβάλλον του ιστού. Κατά συνέπεια, τα νεκρωτικά κύτταρα μπορούν να στρατολογήσουν φλεγμονώδη κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, των οποίων η αποκλειστική λειτουργία είναι να ερευνούν την έκταση της βλάβης των ιστών και να απομακρύνουν τα σχετικά νεκρωτικά υπολείμματα. Τα ανοσοφλεγμονώδη κύτταρα μπορούν να προάγουν όγκους, δεδομένου ότι είναι ικανά να προάγουν την αγγειογένεση, τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και τη διεισδυτικότητα. Επιπλέον, τα νεκρωτικά κύτταρα δύνανται να απελευθερώσουν βιοδραστικούς ρυθμιστικούς παράγοντες, όπως η ιντερλευκίνη IL-1a, που μπορεί να διεγείρει άμεσα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό γειτονικών κυττάρων, με τη δυνατότητα, για άλλη μια φορά, να διευκολύνουν τη νεοπλασματική ανάπτυξη. Κατά συνέπεια, ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος, αν και φαινομενικά ωφέλιμος για την εξισορρόπηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που σχετίζεται με τον καρκίνο, μπορεί τελικά να φανεί και επιζήμιος.



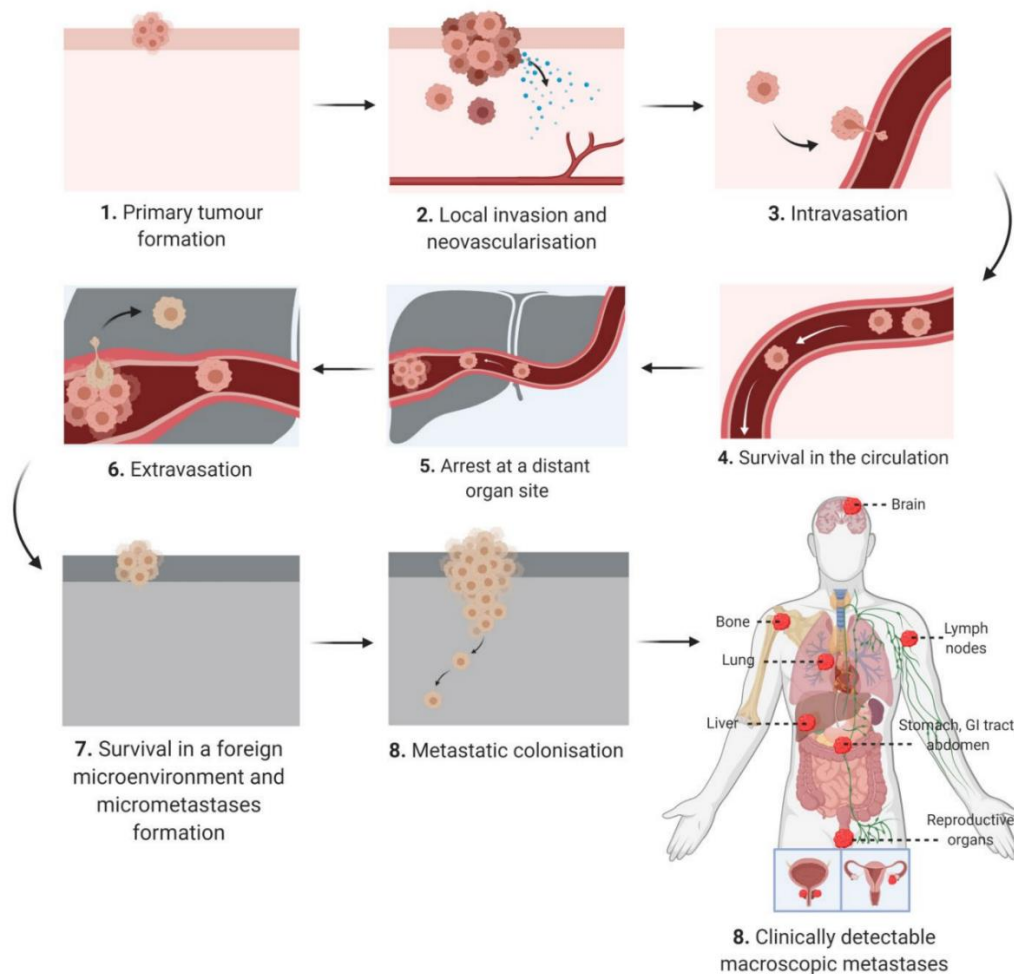


**Εικόνα 4.** Το δίκτυο των σηματοδοτικών πορειών ενός κυττάρου. Παρατηρούμε τα βασικά μονοπάτια, καθώς και τους παράγοντες (ογκογονίδια, αυξητικοί παράγοντες, πρωτεΐνες), που συσχετίζονται με τα βασικά χαρακτηριστικά, που διέπουν τη λειτουργία ενός καρκινικού κυττάρου, όπως η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός. [3]

#### 1.2.4 Η ενεργοποίηση της εισβολής και μετάστασης σε άλλους ιστούς

Η μετάσταση είναι ο γενικός όρος, που χρησιμοποιείται για να περιγράψει την εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων από τον πρωτοπαθή όγκο στους γειτονικούς ιστούς και στα απομακρυσμένα όργανα, και αποτελεί την κύρια αιτία θνησιμότητας του καρκίνου. Υπολογίζεται ότι η μετάσταση είναι υπεύθυνη για το 90% θανάτων από καρκίνο. Προκειμένου να ολοκληρωθεί ο μεταστατικός σηματοδοτικός καταρράκτης, τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να αποκολληθούν από τον πρωτοπαθή όγκο, ξεκινώντας μια τοπική εισβολή. Έπειτα, πρέπει να μεταφερθούν στο κυκλοφορικό και στο λεμφικό σύστημα, σε μια διαδικασία που καλείται ενδοαγγείωση. Αφού αποφύγουν την επίθεση του ανοσοποιητικού συστήματος, ακολουθεί η διαδικασία της εξαγγείωσης, δηλαδή της διαφυγής τους από τα αγγεία, με προορισμό το παρέγχυμα απομακρυσμένων ιστών. Εκεί σχηματίζουν μικρούς όγκους καρκινικών κυττάρων (μικρομετάσταση), γεγονός που εν τέλει οδηγεί στην εισβολή και ανάπτυξη και σε απομακρυσμένα όργανα, μια διαδικασία που καλείται "αποικισμός". [11]





**Εικόνα 5.** Σχηματική αναπαράσταση του σηματοδοτικού καταρράκτη της διαδικασίας της μετάστασης καρκινικών κυττάρων. [12]

Η μετάσταση μπορεί να αναλυθεί σε δύο μεγάλες φάσεις: τη φυσική διάδοση των καρκινικών κυττάρων από τον πρωτοπαθή όγκο σε απομακρυσμένους ιστούς, και την προσαρμογή αυτών των κυττάρων σε ξένα μικροπεριβάλλοντα ιστών, γεγονός που οδηγεί σε επιτυχή αποικισμό. Η διαδικασία της μετάστασης περιλαμβάνει σημαντικές μεταβολές τόσο στα κύτταρα, όσο και στο περιβάλλον τους. Αρκετές κατηγορίες πρωτεϊνών, που εμπλέκονται στη σύνδεση των κυττάρων με το περιβάλλον τους, εμφανίζουν αλλοιώσεις στην λειτουργία τους, σε κύτταρα που διαθέτουν μεταστατικές ικανότητες. Αυτές οι πρωτεΐνες περιλαμβάνουν μόρια προσκόλλησης κυττάρου με κύτταρο (CAMs), μέλη της οικογένειας των καντερινών (cadherins), που μεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου με κύτταρο και ιντεγκρίνες, που συνδέουν τα κύτταρα με υποστρώματα της εξωκυτταρικής μήτρας. Η πιο ευρέως παρατηρούμενη μεταβολή περιλαμβάνει την E-καντερίνη (E-cadherin), ένα μόριο, που εκφράζεται σε όλα τα επιθηλιακά κύτταρα. Η E-καντερίνη βοηθά στη συναρμολόγηση των επιθηλιακών κυτταρικών στρωμάτων και στη διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων μέσα σε αυτά. Επιπλέον, χρησιμεύει ως καταστολέας της εισβολής και της μετάστασης και για αυτόν τον λόγο, η εξάλειψη της λειτουργίας της αποτελεί ένα βασικό βήμα στην απόκτηση της ικανότητας μετάστασης. Η δεύτερη γενική παράμετρος της μεταστατικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων περιλαμβάνει εξωκυτταρίες πρωτεάσες. Τα γονίδια αυτών ρυθμίζονται, έτσι ώστε αυτές να ενεργοποιούνται, και να συμμετέχουν στην αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας και στην πρόσδεση στην κυτταρική επιφάνεια,

γεγονός που διευκολύνει την εισβολή από καρκινικά κύτταρα σε γειτονικούς ιστούς στρωματικών κυττάρων και στα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων.

Αυτές οι αλλαγές, που αναφέρθηκαν προηγουμένως, αποτελούν σημείο κλειδί στο πρόγραμμα που ρυθμίζει την εισβολή και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Η EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) είναι η διαδικασία, μέσω της οποίας τα μετασχηματισμένα επιθηλιακά κύτταρα αναπτύσσουν την ικανότητα να εισβάλλουν, να αντιστέκονται στο στρες και να διαδίδονται. Τα επιθηλιακά κύτταρα είναι ακίνητα και στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους και με τη γειτονική εξωκυτταρική μήτρα (ECM). Η EMT περιλαμβάνει αναστρέψιμες βιοχημικές αλλοιώσεις, που επιτρέπουν σε ένα συγκεκριμένο επιθηλιακό κύτταρο να αποκτήσει μεσεγχυματικό φαινότυπο και προσδίδει επιθηλιακή-μεσεγχυματική πλαστικότητα στα επιθηλιακά κύτταρα, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για την εξέλιξη και τη μετάσταση του καρκίνου. [5], [13] Βέβαια, τα καρκινικά κύτταρα που έχουν διαδοθεί από έναν πρωτοπαθή όγκο σε μια πιο απομακρυσμένη θέση ιστού ενδέχεται να μην ωφελούνται πλέον και μπορεί να περάσουν από την αντίστροφη διαδικασία, που ονομάζεται μεσεγχυματική-επιθηλιακή μετάβαση (MET).

Εκτός από την EMT οδό, δύο άλλοι διακριτοί τρόποι εισβολής έχουν εντοπιστεί και εμπλέκονται στην εισβολή των καρκινικών κυττάρων, οι οποίοι περιλαμβάνουν είτε οζίδια καρκινικών κυττάρων που προωθούνται μαζικά σε παρακείμενους ιστούς, είτε μεμονωμένα καρκινικά κύτταρα, που παρουσιάζουν μορφολογική πλαστικότητα, γεγονός που τους επιτρέπει να ολισθαίνουν μέσα από υπάρχοντα διάκενα στην εξωκυτταρική μήτρα, αντί να ανοίγουν μια διαδρομή για τον εαυτό τους. Η τελευταία αυτή ιδιότητα αποτελεί μια ένδειξη, ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ καρκινικών κυττάρων και κυττάρων του νεοπλασματικού στρώματος, εμπλέκεται στην ικανότητα των καρκινικών κυττάρων για μετάσταση. Ένα παράδειγμα είναι τα μακροφάγα στην περιφέρεια του όγκου, τα οποία μπορούν να προάγουν την τοπική εισβολή παρέχοντας ένζυμα αποικοδόμησης της μήτρας. [3], [13]

Σε γενικά πλαίσια, ο μηχανισμός της μετάστασης είναι αρκετά πολύπλοκος, αλλά ταυτόχρονα ένα, αναπόσπαστο και μεγίστης σημασίας, γνώρισμα των καρκινικών κυττάρων.

### **1.2.5 Πρόκληση αγγειογένεσης**

Το οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά, που παρέχονται από τα αγγεία, είναι ζωτικής σημασίας για τη λειτουργία και την επιβίωση των κυττάρων, υποχρεώνοντας ουσιαστικά όλα τα κύτταρα σε έναν ιστό να βρίσκονται σε απόσταση 100 μm από ένα τριχοειδές αιμοφόρο αγγείο. Κατά τη διάρκεια της οργανογένεσης, αυτή η εγγύτητα εξασφαλίζεται από τη συντονισμένη ανάπτυξη των αγγείων και του παρεγχύματος. Μόλις σχηματιστεί ένας ιστός, η ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων, δηλαδή η διαδικασία της αγγειογένεσης είναι παροδική και ρυθμίζεται προσεκτικά. Όπως οι φυσιολογικοί ιστοί, έτσι και οι όγκοι απαιτούν θρεπτικές ουσίες και οξυγόνο, καθώς και την ικανότητα να εκκενώνουν τα μεταβολικά απόβλητα και το διοξείδιο του άνθρακα. Για αυτόν τον λόγο, κρίνεται απαραίτητο για την επιβίωσή τους, να αναπτύξουν αγγειογενετική ικανότητα. Η αγγειογένεση χαρακτηρίζεται από βλάστηση τριχοειδών αγγείων, υπερβολική διακλάδωση ήδη υπαρχόντων αγγείων, παραμορφωμένα και διευρυμένα αγγεία, ακανόνιστη ροή αίματος, μη φυσιολογικά επίπεδα πολλαπλασιασμού ενδοθηλιακών κυττάρων και αιμορραγία. Σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς ιστούς, κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου, ένας «διακόπτης», που ρυθμίζει την αγγειογένεση σχεδόν πάντα ενεργοποιείται, προκαλώντας τη δημιουργία νέων αγγείων, που βοηθούν στη διατήρηση των επεκτεινόμενων καρκινικών κυττάρων. [14]

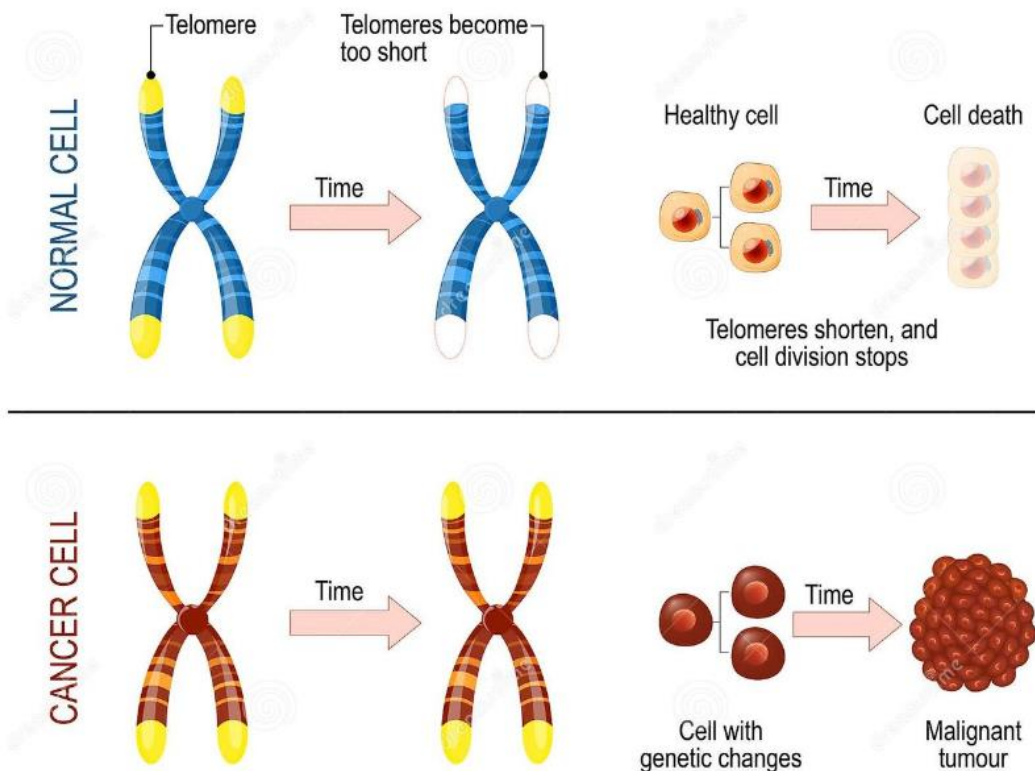
Μερικοί από αυτούς τους ρυθμιστές της αγγειογένεσης είναι πρωτεΐνες σηματοδότησης, που συνδέονται με διεγερτικούς ή ανασταλτικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων και προέρχονται από τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα πιο γνωστά μόρια επαγωγής και αναστολής της αγγειογένεσης, είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας-A (VEGF-A) και η θρομβοσπονδίνη-1 (TSP-1), αντίστοιχα. Οι ιντεγκρίνες και τα μόρια προσκόλλησης, που μεσολαβούν στη σύνδεση κυττάρου-μήτρας και κυττάρου-κυττάρου διαδραματίζουν επίσης κρίσιμο ρόλο. Το γονίδιο *VEGF-A* κωδικοποιεί προσδέτες, που εμπλέκονται στην ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και στη συνέχεια στην ομοιοστατική επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς και σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις στον ενήλικα. Η σηματοδότηση VEGF μέσω τυροσινικών κινασών, τριών υποδοχών (VEGFR-1-3), ρυθμίζεται σε πολλαπλά επίπεδα. Έτσι, η έκφραση του γονιδίου *VEGF* μπορεί να ρυθμιστεί θετικά, τόσο σε συνθήκες υποξίας, όσο και από τη σηματοδότηση κάποιου ογκογονιδίου. Για παράδειγμα, σε ορισμένους όγκους, τα κυρίαρχα ογκογονίδια, που λειτουργούν εντός των καρκινικών κυττάρων, όπως τα *Ras* και *Myc*, μπορούν να ρυθμίσουν θετικά την έκφραση αγγειογενετικών παραγόντων. Επιπλέον, άλλα προαγγειογενετικά σηματοδοτικά μόρια, όπως μέλη της οικογένειας του αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (FGF), έχουν εμπλακεί στη διατήρηση της αγγειογένεσης του όγκου, όταν υπερεκφράζονται σε αυτόν. Όσον αφορά τους αναστολείς, οι περισσότεροι είναι πρωτεΐνες, που προέρχονται από πρωτεολυτική διάσπαση δομικών πρωτεϊνών, οι οποίες δεν είναι οι ίδιες ρυθμιστές της αγγειογένεσης. Ένας αριθμός από αυτούς τους ενδογενείς αναστολείς της αγγειογένεσης μπορεί να ανιχνευθεί στην κυκλοφορία του αίματος. Υπό κανονικές συνθήκες αυτοί οι αναστολείς χρησιμεύουν ως φυσιολογικοί ρυθμιστές, που ρυθμίζουν την παροδική αγγειογένεση κατά την αναδιαμόρφωση των ιστών και την επούλωση τραυμάτων. Στα καρκινικά κύτταρα, η έκφραση ενδογενών αναστολέων, όπως η θρομβοσπονδίνη-1 ή η β-ιντερφερόνη ρυθμίζεται αρνητικά. Για παράδειγμα, ο αναστολέας θρομβοσπονδίνης-1 έχει βρεθεί ότι ρυθμίζεται θετικά από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους. Κατά συνέπεια, η απώλεια της λειτουργίας του p53, η οποία εμφανίζεται στους περισσότερους ανθρώπινους όγκους, μπορεί να προκαλέσει πτώση των επιπέδων της θρομβοσπονδίνης-1, αδυνατώντας να αναστείλει την αγγειογένεση. [5], [15]

### **1.2.6 Αναπαραγωγική αθανασία**

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, τα καρκινικά κύτταρα απαιτούν απεριόριστο δυναμικό αναπαραγωγής, προκειμένου να δημιουργήσουν μακροσκοπικούς όγκους. Αυτή η ικανότητα έρχεται σε έντονη αντίθεση με τη συμπεριφορά των κυττάρων στις περισσότερες φυσιολογικές κυτταρικές σειρές του σώματος, οι οποίες μπορούν να περάσουν μόνο από έναν περιορισμένο αριθμό διαδοχικών κύκλων ανάπτυξης και διαίρεσης. Αυτός ο περιορισμός έχει συσχετιστεί με δύο διακριτά εμπόδια στον πολλαπλασιασμό: τη γήρανση, μια τυπικά μη αναστρέψιμη είσοδο σε μια μη πολλαπλασιαστική, αλλά βιώσιμη κατάσταση, και την κρίση, η οποία χαρακτηρίζεται από καρυοτυπική αταξία που σχετίζεται με σύντηξη των χρωμοσωμάτων, και μαζικό κυτταρικό θάνατο. Σε σπάνιες περιπτώσεις, τα κύτταρα ξεφεύγουν από τις φάσεις της γήρανσης και της κρίσης και παρουσιάζουν απεριόριστες δυνατότητες αναπαραγωγής. Αυτή η μετάβαση έχει ονομαστεί αθανатоποίηση, ένα χαρακτηριστικό που διαθέτουν οι περισσότερες καρκινικές κυτταρικές σειρές, λόγω της ικανότητάς τους να πολλαπλασιάζονται σε καλλιέργεια χωρίς ενδείξεις γήρανσης ή κρίσης.

Υπάρχουν πολλά στοιχεία που καταδεικνύουν, ότι τα τελομερή, που αποτελούνται από πολλαπλές διαδοχικές επαναλήψεις εξανουκλεοτιδίων και προστατεύουν τα άκρα των

χρωμοσωμάτων, εμπλέκονται στην ικανότητα ορισμένων κυττάρων να πολλαπλασιάζονται απεριόριστα. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, στα άκρα κάθε χρωμοσώματος παρατηρείται απώλεια-βράχυνση των τελομερών. Η προοδευτική απώλεια των τελομερών, μέσω διαδοχικών κύκλων αντιγραφής, έχει ως συνέπεια την απώλεια της ικανότητά τους να προστατεύουν τα άκρα του χρωμοσωμικού DNA. Τα απροστάτευτα χρωμοσωμικά άκρα συμμετέχουν σε χρωμοσωμικές συντήξεις από άκρο σε άκρο, προκαλώντας την αταξία στον καρυότυπο, που σχετίζεται με την κρίση και εν κατακλείδι καταλήγει στον θάνατο του κυττάρου. Το γεγονός αυτό έχει αποδοθεί στην αδυναμία των DNA πολυμερασών να αντιγράψουν πλήρως τα 3' άκρα του χρωμοσωμικού DNA, κατά τη διάρκεια της S φάσης της κυτταρικής ανάπτυξης. Σε αντιδιαστολή με τα φυσιολογικά κύτταρα, η διατήρηση των τελομερών είναι εμφανής σχεδόν σε όλους τους τύπους κακοήθων κυττάρων. Το 85%-90% από αυτούς το επιτυγχάνουν ρυθμίζοντας θετικά την έκφραση του ενζύμου τελομεράσης, η οποία συνιστά μια εξειδικευμένη πολυμεράση DNA, η οποία προσθέτει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες εξανουκλεοτιδίων στα άκρα του τελομερούς DNA. Κατά αυτόν τον τρόπο, η τελομεράση είναι σε θέση να αντιμετωπίσει την προοδευτική διάβρωση των τελομερών, που θα εμφανιζόταν απουσία της. Επιπρόσθετα, τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν και έναν δεύτερο μηχανισμό διατήρησης των τελομερών, που βασίζεται στην διαχρωμοσωμική ανταλλαγή πληροφοριών της αλληλουχίας των τελομερών, μέσω ανασυνδυασμού. Βέβαια, αξίζει να αναφερθεί πως, η απώλεια της τελομεράσης σε προκαρκώδη κύτταρα, τα οποία προορίζονται γενετικά να αναπτύξουν μορφές καρκίνου, ενδέχεται να οδηγεί και σε μειωμένη ογκογένεση, λόγω των διαδικασιών της γήρανσης και απόπτωσης σε αυτά τα κύτταρα. [3], [5]



**Εικόνα 6.** Το φαινόμενο της απώλειας των τελομερών στα άκρα του χρωμοσώματος κατά την διάρκεια των κυτταρικών διαιρέσεων, σε ένα υγιές και σε ένα καρκινικό κύτταρο. [5]

Τέλος, εκτός από τη συντήρηση των τελομερών, η τελομεράση έχει βρεθεί πως μπορεί να προωθήσει την ογκογένεση και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, μέσω ενίσχυσης της πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης των κυττάρων αυτών.

### **1.2.7 Επαναπρογραμματισμός του ενεργειακού μεταβολισμού**

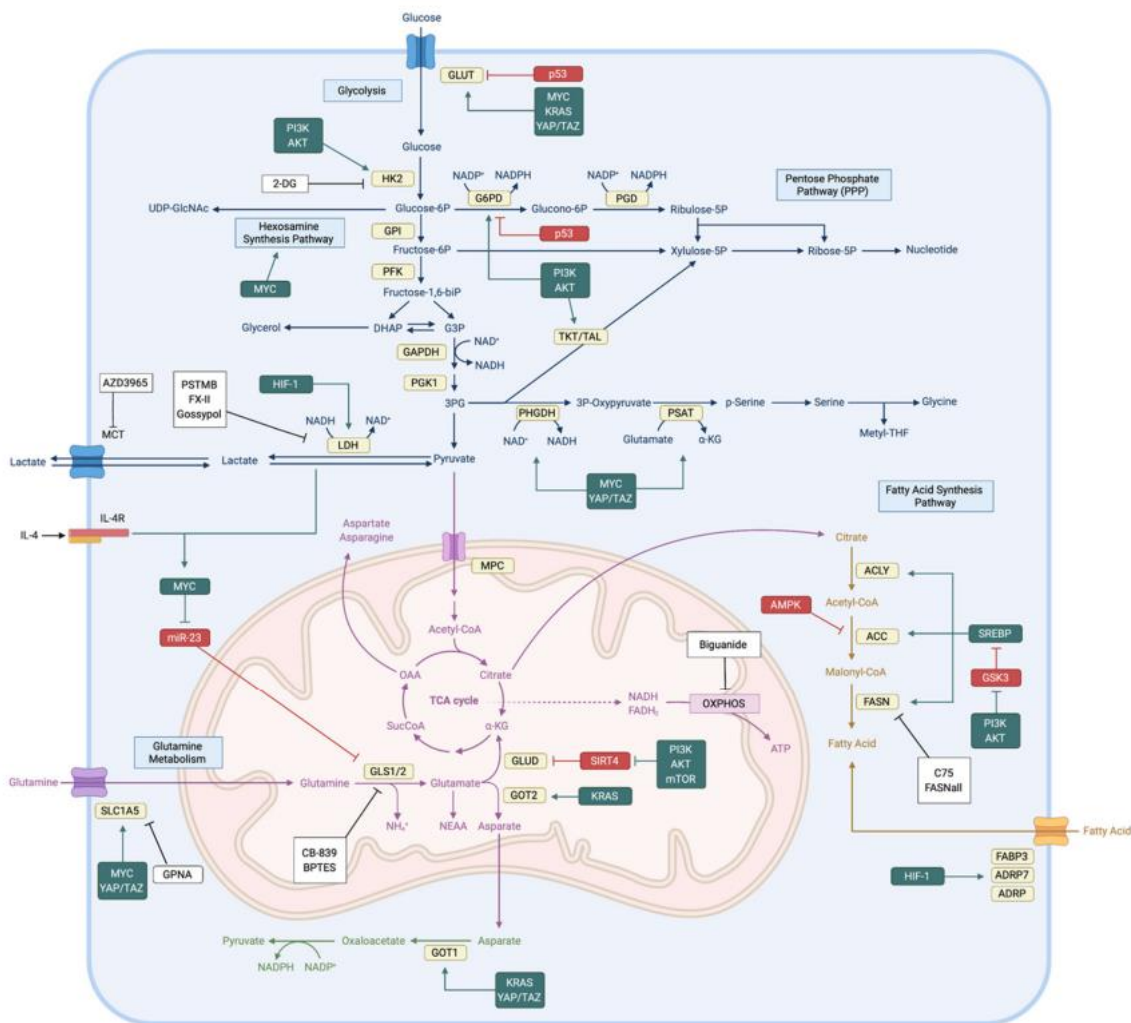
Ο χρόνιος και ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός περιλαμβάνει, όχι μόνο τον απορυθμισμένο έλεγχο του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, αλλά και αντίστοιχες προσαρμογές του ενεργειακού μεταβολισμού με απώτερο σκοπό την προώθηση της κυτταρικής ανάπτυξης και επιβίωσης. Το κοινό χαρακτηριστικό αυτού του αλλιωμένου μεταβολισμού είναι η αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης και η ζύμωση της γλυκόζης σε γαλακτικό. Ο μεταβολισμός της γλυκόζης επιτρέπει την αξιοποίηση ενέργειας με τη μορφή ATP, μέσω της οξειδωσης δεσμών άνθρακα. Υπό αερόβιες συνθήκες, τα φυσιολογικά κύτταρα επεξεργάζονται τη γλυκόζη, πρώτα σε πυροσταφυλικό οξύ, μέσω γλυκόλυσης στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια σε διοξείδιο του άνθρακα στα μιτοχόνδρια. Αντίθετα υπό αναερόβιες συνθήκες, ευνοείται η γλυκόλυση και επομένως μικρή ποσότητα πυροσταφυλικού καταλήγει στα μιτοχόνδρια, για να καταναλωθεί υπό την παρουσία οξυγόνου. Στα καρκινικά κύτταρα, ακόμα και παρουσία οξυγόνου ή σωστής λειτουργίας των μιτοχονδρίων, η παραγωγή ενέργειας περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό στη γλυκόλυση, οδηγώντας σε μια κατάσταση που ονομάζεται «αερόβια γλυκόλυση». Αυτό το φαινόμενο είναι γνωστό ως φαινόμενο Warburg. Το φαινόμενο αυτό με την πρώτη ματιά μοιάζει οξύμωρο, καθώς η γλυκόλυση είναι ένα αναποτελεσματικό μέσο παραγωγής ATP σε σύγκριση με την ποσότητα που λαμβάνεται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια (18 φορές χαμηλότερη απόδοση). Ωστόσο, ο ρυθμός μεταβολισμού της γλυκόζης μέσω της γλυκόλυσης είναι υψηλότερος, έτσι ώστε η παραγωγή γαλακτικού από τη γλυκόζη να συμβαίνει 10-100 φορές ταχύτερα από την πλήρη οξειδωση της γλυκόζης στα μιτοχόνδρια. Αυτός είναι και ένας σημαντικός λόγος, για τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα επαναπρογραμματίζουν τον μεταβολισμό τους προς την γλυκολυτική πορεία. Επιπρόσθετα, το φαινόμενο Warburg έχει ανακαλυφθεί ότι σχετίζεται με ογκογονίδια (π.χ. RAS, MYC), μεταλλαγμένους καταστολείς όγκου (π.χ. TP53), ή ακόμα και με την υποξία, που όπως θα δούμε παρακάτω επικρατεί συνήθως στο μικροπεριβάλλον ενός καρκινικού κυττάρου. Όλοι αυτοί οι παράγοντες φαίνεται να ρυθμίζουν θετικά την γλυκόλυση έναντι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως, σε ορισμένους όγκους υφίστανται διαφορετικοί υποπληθυσμοί καρκινικών κυττάρων, που διαφέρουν ως προς τις οδούς παραγωγής ενέργειας, αλλά συγχρόνως δρουν συνεργατικά. Έτσι, κάποια υποξικά καρκινικά κύτταρα, που εμφανίζουν το φαινόμενο Warburg, εκκρίνουν γαλακτικό οξύ, ενώ κύτταρα καλύτερα οξυγονωμένα χρησιμοποιούν το γαλακτικό, που παράγεται από γειτονικά κύτταρα ως κύρια πηγή ενέργειας, μέσω του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος. [16], [17]

Εκτός του μεταβολισμού της γλυκόζης, σημαντικός για τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται να είναι και αυτός της γλουταμίνης και των λιπαρών οξέων. Η γλουταμίνη είναι το πιο άφθονο αμινοξύ στο πλάσμα. Καθώς αποτελεί πηγή άνθρακα και αζώτου, η γλουταμίνη είναι κρίσιμη για τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, καθώς το άζωτο είναι ένας απαραίτητος μεταβολίτης για τη βιοσύνθεση νουκλεοτιδίων και η γλουταμίνη αποτελεί πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση άλλων μη βασικών αμινοξέων (Non-Essential Amino Acids, NEAAs) και λιπαρών οξέων. Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη ζήτηση για αμινοξέα, για την υποστήριξη του ρυθμού ανάπτυξής τους. Έτσι, τα καρκινικά κύτταρα προσπαθούν να ικανοποιήσουν αυτές τις απαιτήσεις, αυξάνοντας τον μεταβολισμό της γλουταμίνης. Η γλουταμίνη εισάγεται στο κυτταρόπλασμα μέσω του μεταφορέα ASCT2, του οποίου τη

δραστηριότητα προάγουν πολλά σήματα, που προωθούν και την ογκογένεση και καταλύεται από το ένζυμο γλουταμινάση (GLS1/2) σε γλουταμικό και αμμωνία.

Το δεύτερο μεταβολικό μονοπάτι της γλουταμίνης συμβαίνει όταν χρησιμεύει ως δότης άνθρακα για τη σύνθεση λιπαρών οξέων. Επειδή η πλασματική μεμβράνη και τα υποκυτταρικά οργανίδια αποτελούνται από λιπιδικές διπλές στοιβάδες, απαιτείται *de novo* βιοσύνθεση λιπιδίων για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Στα φυσιολογικά κύτταρα, το μεγαλύτερο μέρος του ακετυλο-CoA, το οποίο είναι πρόδρομος για τη σύνθεση λιπαρών οξέων, προέρχεται από τη γλυκόλυση. Ωστόσο, λόγω της αερόβιας γλυκόλυσης, τα καρκινικά κύτταρα συνήθως μετατρέπουν το πυροσταφυλικό σε γαλακτικό παρά σε ακετυλο-CoA. Υπό αυτές τις συνθήκες, το μεγαλύτερο μέρος του ακετυλο-CoA στα καρκινικά κύτταρα αποκτάται από τον κύκλο γλουταμίνης-τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA). Η γλουταμίνη καταλύεται σε ακετογλουταμικό, το οποίο στη συνέχεια εισέρχεται στην αναβολική φάση του κύκλου TCA για να παράγει κιτρικό. Το κιτρικό μετατοπίζεται από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα και καταλύεται σε ακετυλο-CoA από το ένζυμο, ATP κιτρική λυάση (ACLY). Στη συνέχεια, η συνθετάση λιπαρών οξέων (FASN) μεσολαβεί στη σύνθεση λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας. Η γλουταμίνη τροφοδοτεί τα ενδιάμεσα του κύκλου TCA, τα οποία αναδεικνύονται ως μεσολαβητές κακοήθους μετασχηματισμού στον καρκίνο. Ως αποτέλεσμα της αερόβιας γλυκόλυσης και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, η γλουταμίνη γίνεται η κύρια πηγή NADH και FADH<sub>2</sub> στα καρκινικά κύτταρα.

Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες υπογραμμίζουν τη σημασία του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων στην εξέλιξη του καρκίνου. Τα λιπίδια είναι τα βασικά συστατικά των μεμβρανών και είναι τα δομικά στοιχεία που αποτελούν τα κύτταρα. Η απορρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων είναι ένα από τα κύρια μεταβολικά χαρακτηριστικά του καρκίνου. Χρησιμεύουν για τη ρύθμιση διαφόρων βιοχημικών διεργασιών, όπως η βιοσύνθεση μεμβρανών, η αποθήκευση ενέργειας και οι οδοί σηματοδότησης, στις οποίες δρουν ως δευτερεύοντες αγγελιοφόροι. Τα καρκινικά κύτταρα συνθέτουν έως και το 95% των λιπαρών οξέων *de novo*, γεγονός που υποδηλώνει ότι η δραστηριότητα της οδού σύνθεσης λιπαρών οξέων είναι απαραίτητη για την καρκινογένεση. Η λιπογένεση ρυθμίζεται μεταγραφικά από πρωτεΐνες που δεσμεύουν ενώσεις, που ρυθμίζουν τα επίπεδα στερόλης (Sterol Regulatory Element Binding Proteins, SREBPs). Η ενεργοποίηση των SREBPs διεγείρεται από το μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR, το οποίο είναι το πιο συχνά ενεργοποιημένο ογκογόνο μονοπάτι σηματοδότησης σε καρκίνους. [18], [19]



**Εικόνα 7.** Σηματοδοτικά μονοπάτια, που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων. [19]

Εν κατακλείδι, ο επαναπρογραμματισμός του μεταβολισμού είναι ένα βασικό γνώρισμα του καρκίνου, που όπως θα δούμε παρακάτω έχει και αρκετές συνέπειες για το περιβάλλον του όγκου.

### 1.2.8 Αποφυγή καταστολής από το ανοσοποιητικό

Ένα σημαντικό ζήτημα σε σχέση με την ογκογένεση είναι ο ρόλος, που διαδραματίζει το ανοσοποιητικό σύστημα στην αντίσταση ή την εξάλειψη του σχηματισμού και της εξέλιξης όγκων. Το ανοσοποιητικό σύστημα λειτουργεί ως σημαντικός φραγμός στον σχηματισμό και την εξέλιξη του όγκου, όταν αυτός βρίσκεται σε αρχικό στάδιο, τουλάχιστον σε ορισμένες μορφές καρκίνου, που δεν προκαλείται από ιούς. Σύμφωνα με αυτή τη λογική, οι συμπαγείς όγκοι που εμφανίζονται, κατάφεραν με κάποιο τρόπο να αποφύγουν την ανίχνευση και καταστολή από το ανοσοποιητικό σύστημα. Στην περίπτωση αυτή, τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται γρηγορότερα από ό,τι μπορεί να χειριστεί το ανοσοποιητικό σύστημα, μέσω στρατηγικών, που εξαπατούν το ανοσοποιητικό σύστημα και αποτρέπουν επιθέσεις από αυτό. Για να γίνει αυτό, τα καρκινικά κύτταρα αρχίζουν να χτίζουν ένα μικροπεριβάλλον, ξεκινώντας από τη στιγμή της εμφάνισης της νόσου και όταν πλέον ο κακοήθης όγκος έχει εξαπλωθεί, το περιβάλλον αυτό καθιστά πιο δύσκολη την



καταπολέμησή του. Για παράδειγμα, η εξάντληση αμινοξέων (αργινίνη, τρυπτοφάνη) και η συγκέντρωση μεταβολιτών, όπως η γλυκόζη, το γαλακτικό και η γλουταμίνη στο μικροπεριβάλλον του όγκου, επηρεάζουν τη λειτουργία μηχανισμών και κυττάρων που θα μπορούσαν να δρουν αντικαρκινικά. [5], [20]

### **1.2.9 Αστάθεια του γονιδιώματος και δημιουργία μεταλλάξεων**

Η εξαιρετική ικανότητα των συστημάτων συντήρησης του γονιδιώματος, να ανιχνεύουν και να επιλύουν βλάβες στο DNA, διασφαλίζει ότι τα ποσοστά μεταλλάξεων είναι συνήθως πολύ χαμηλά, κατά τη διάρκεια κάθε κυτταρικής διαίρεσης. Συνεπώς, τα καρκινικά κύτταρα, για να αναπτυχθούν, πρέπει να αποκτήσουν έναν μεταλλαγμένο γονότυπο, ο οποίος θα τους δώσει το πλεονέκτημα να επιβιώσουν και να κυριαρχήσουν στο περιβάλλον τους. Αυξημένα επίπεδα μετάλλαξης επιτυγχάνονται με διάφορους τρόπους, όπως μέσω αυξημένης ευαισθησίας σε μεταλλαξιγόνους παράγοντες, είτε μέσω εσφαλμένης δράσης γονιδίων, που αποτελούν "φύλακες" του συστήματος της διατήρησης της γονιδιακής ακεραιότητας του DNA. Τέτοια γονίδια εμπλέκονται στην ανίχνευση βλαβών στο DNA, σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης και στην αδρανοποίηση ή αναχαίτιση μεταλλαξιγόνων μορίων, προτού καταστρέψουν το DNA. Δύο συγκεκριμένα παραδείγματα αποτελούν, το ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 και η τελομεράση. Συμπεραίνουμε, πως ελαττώματα στη συντήρηση και την επιδιόρθωση του γονιδιώματος δρουν ευεργετικά για τα καρκινικά κύτταρα, και επομένως προάγουν την εξέλιξη του όγκου. [21]

### **1.2.10 Φλεγμονές, που προωθούν την ογκογένεση**

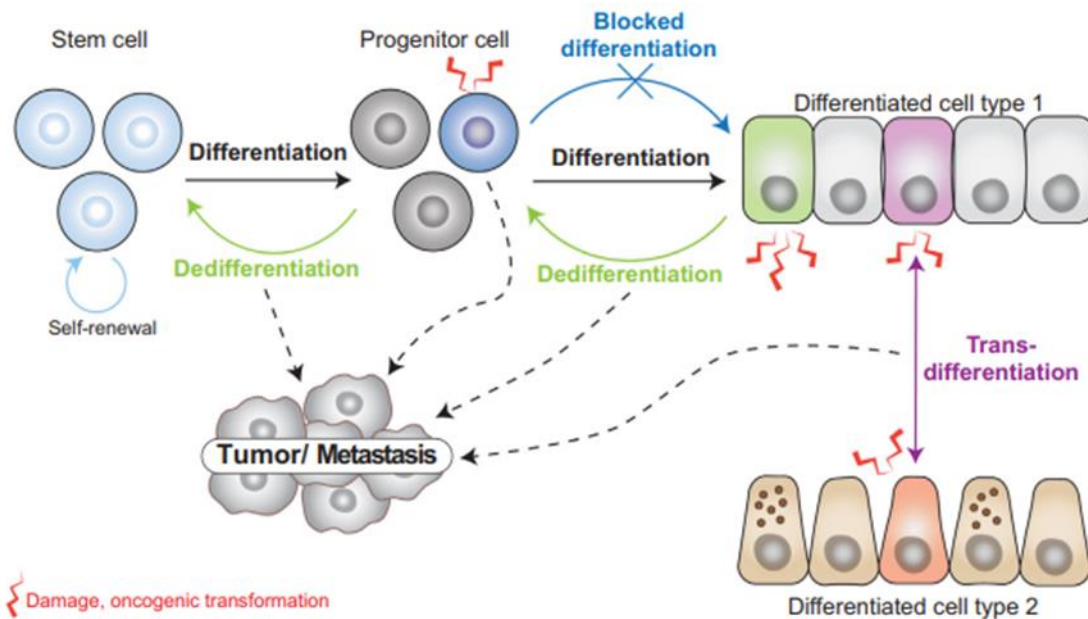
Η ύπαρξη φλεγμονής, λόγω συγκέντρωσης κυττάρων του ανοσοποιητικού, σε έναν όγκο, μπορεί να υποδηλώνει την προσπάθεια του ανοσοποιητικού συστήματος να εξαλείψει τα καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, η φλεγμονώδης απόκριση μπορεί να συμβάλει στην ογκογένεση, παρέχοντας βιοενεργά μόρια στο μικροπεριβάλλον του όγκου, συμπεριλαμβανομένων, αυξητικών παραγόντων, που υποστηρίζουν την πολλαπλασιαστική σηματοδότηση, παραγόντων επιβίωσης, που περιορίζουν τον κυτταρικό θάνατο, προαγγειογενετικών παραγόντων και ενζύμων τροποποίησης της εξωκυτταρικής μήτρας, που διευκολύνουν την αγγειογένεση, την εισβολή και την μετάσταση. [5]

### **1.2.11 Ενεργοποίηση της φαινοτυπικής πλαστικότητας**

Στους φυσιολογικούς ιστούς, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της οργάνωσης των κυττάρων σε ιστούς, προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιοστασία, τα κύτταρα σταματούν την ανάπτυξή τους και διαφοροποιούνται. Ως εκ τούτου, η διαδικασία της κυτταρικής διαφοροποίησης (differentiation) αποτελεί σαφές εμπόδιο στον συνεχιζόμενο πολλαπλασιασμό, που είναι απαραίτητος για τη ογκογένεση. Για αυτόν τον λόγο, η ενεργοποίηση της φυσιολογικά περιορισμένης ικανότητας για αλλαγή του φαινότυπου (φαινοτυπική πλαστικότητα), προκειμένου τα καρκινικά κύτταρα να αποφύγουν την κατάσταση της τελικής διαφοροποίησης, είναι ένα κρίσιμο στάδιο της ανάπτυξης του καρκίνου. Η ενεργοποίηση της φαινοτυπικής πλαστικότητας μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους. Καρκινικά κύτταρα, που προέρχονται από ένα φυσιολογικό κύτταρο, που είχε προχωρήσει στο τελικό στάδιο της διαφοροποίησης, μπορούν να αντιστρέψουν την πορεία τους σε καταστάσεις, που μοιάζουν με προγονικά κύτταρα (dedifferentiation), μέσω καταστολής της έκφρασης μεταγραφικών παραγόντων, που ευνοούν τη διαφοροποίηση. Αντίθετα, τα νεοπλασματικά κύτταρα, που προκύπτουν από ένα προγονικό κύτταρο, το οποίο προορίζεται να ακολουθήσει μια οδό, που οδηγεί σε διαφοροποίηση τελικού σταδίου,



δύνανται να μπλοκάρουν τη διαδικασία (blocked differentiation), και ως αποτέλεσμα να διατηρηθούν σε μια μερικώς διαφοροποιημένη, προγονική κατάσταση. Εναλλακτικά, μπορεί να λειτουργήσει η διαδικασία της δια-διαφοροποίησης (transdifferentiation), στην οποία κύτταρα, που αρχικά είχαν δεσμευτεί να ακολουθήσουν ένα μονοπάτι διαφοροποίησης, μεταπηδούν σε ένα εντελώς διαφορετικό αναπτυξιακό μονοπάτι, αποκτώντας έτσι διαφορετικά χαρακτηριστικά από αυτά, που προοριζόταν να διαθέτουν. Αυτές οι τρεις υποκατηγορίες ενεργοποίησης της φαινοτυπικής πλαστικότητας παρουσιάζονται και στην **Εικόνα 8**, και φαίνεται να υφίστανται σε πολλαπλούς τύπους καρκίνου, τόσο κατά τον σχηματισμό του πρωταρχικού όγκου, όσο και κατά την κακοήθη εξέλιξη του. [22], [23]



**Εικόνα 8.** Αναπαράσταση των τριών βασικών μηχανισμών απόκτησης της φαινοτυπικής πλαστικότητας των καρκινικών κυττάρων. [23]

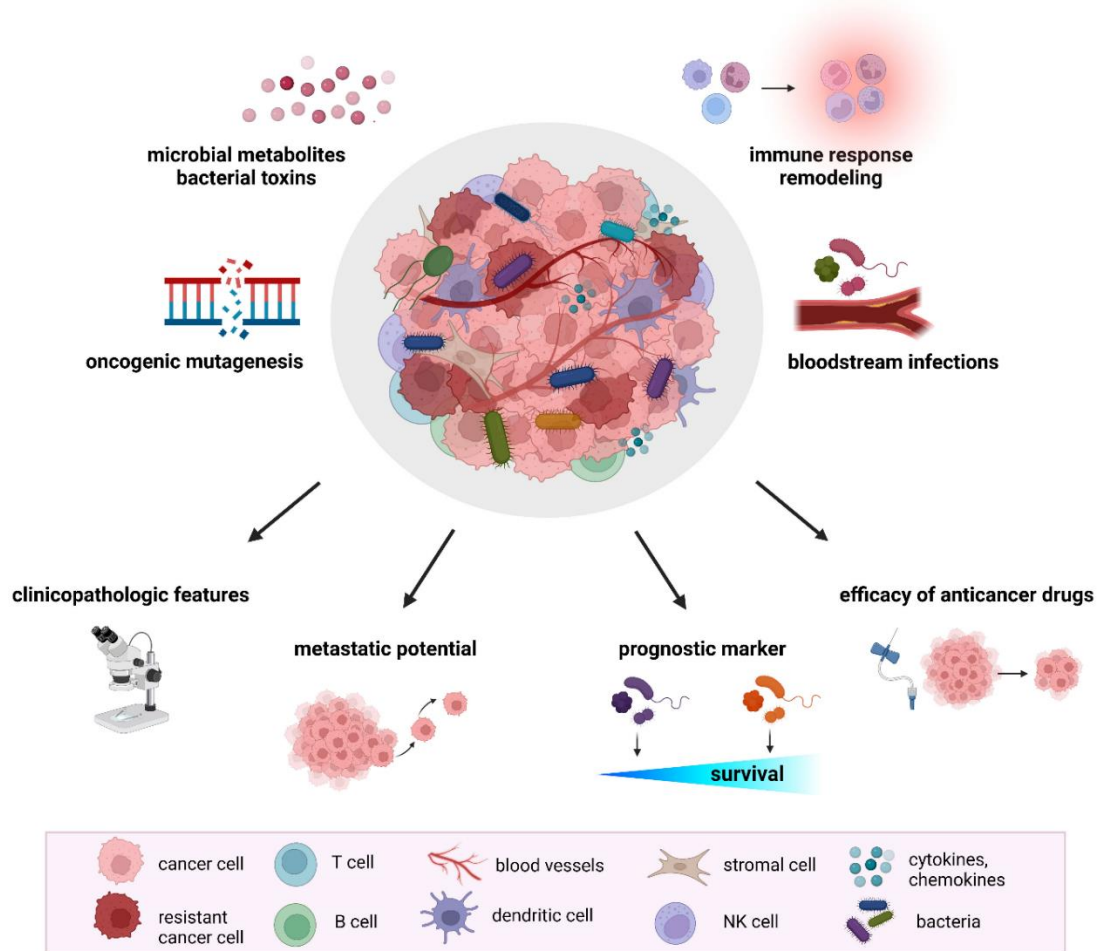
### 1.2.12 Επιγενετικός επαναπρογραμματισμός

Εκτός από μεταλλάξεις σε γονίδια, που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και επιβίωση των κυττάρων, και την αστάθεια του γονιδιώματος, έχει αναφερθεί ένας άλλος τρόπος επαναπρογραμματισμού του γονιδιώματος, ο οποίος περιλαμβάνει επιγενετικά ρυθμιζόμενες αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, και μπορεί να χαρακτηριστεί ως «μη μεταλλαγμένος επιγενετικός επαναπρογραμματισμός». Η μη μεταλλαγμένη επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης έχει καθιερωθεί ως ο κεντρικός μηχανισμός, που μεσολαβεί στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, διαφοροποίηση και οργανογένεση. Παρόλα αυτά, όλο και περισσότερες ενδείξεις υποστηρίζουν, ότι ανάλογες επιγενετικές αλλοιώσεις, μπορούν να συμβάλλουν στην απόκτηση χαρακτηριστικών από τα καρκινικά κύτταρα κατά την ανάπτυξη του όγκου. Σε αυτό έχει βρεθεί, πως σημαντικό ρόλο έχει το μικροπεριβάλλον του όγκου, το οποίο μπορεί να επιφέρει αλλαγές στο επιγονιδίωμα, δηλαδή στον μηχανισμό, με τον οποίο το κύτταρο ελέγχει τη λειτουργικότητα των γονιδιακών περιοχών. Τέτοιες αλλαγές μπορεί να είναι ευεργετικές προς τα καρκινικά κύτταρα σχετικά με την επιλογή και ανάπτυξη φαινοτύπου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα του επιγενετικού επαναπρογραμματισμού, που προέρχεται από το μικροπεριβάλλον του όγκου, αποτελούν, η επιγενετική ρύθμιση που προκαλείται από υποξία, καθώς επίσης και η αναστρέψιμη επαγωγή της διεισδυτικότητας

καρκινικών κυττάρων στα όρια πολλών συμπαγών όγκων, που ενορχηστρώνεται από το αναπτυξιακό ρυθμιστικό πρόγραμμα EMT. [24], [25]

### **1.2.13 Πολυμορφικά μικροβιώματα**

Ένα σύγχρονο και αρκετά ενδιαφέρον θέμα, που απασχολεί την διεθνή επιστημονική κοινότητα, αποτελεί η συμβίωση και η συνεισφορά του συνόλου των μικροοργανισμών και βακτηρίων, που βρίσκονται φυσιολογικά σε ιστούς, όπως η επιδερμίδα, και το εσωτερικό βλεννογόνο του γαστρεντερικού σωλήνα και άλλων οργάνων. Το μικροβίωμα αυτό έχει σημαντικό αντίκτυπο τόσο για την υγεία του οργανισμού, αλλά συγχρόνως ενδέχεται να συμμετέχει και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Για παράδειγμα, δύναται να έχει είτε προστατευτικές, είτε επιβλαβείς δράσεις στην ανάπτυξη όγκου, την κακοήθη εξέλιξη και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Ένα συγκεκριμένο παράδειγμα, συνιστά το μικροβίωμα του εντέρου, το οποίο είναι θεμελιωδώς σημαντικό για τη λειτουργία του παχέος εντέρου, αλλά ταυτόχρονα ενδέχεται να ευθύνεται για την ανάπτυξη καρκίνου. Αυτό το γεγονός μπορεί να οφείλεται σε κάποια μετάλλαξη στο επιθήλιο του παχέος εντέρου, ως αποτέλεσμα της παραγωγής βακτηριακών τοξινών και άλλων μορίων, που είτε βλάπτουν άμεσα το DNA, είτε διαταράσσουν τα συστήματα που διατηρούν τη γονιδιακή ακεραιότητα. Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι ορισμένα βακτήρια συνδέονται στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων του παχέος εντέρου και παράγουν ουσίες, που διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων, προσδίδοντας στα νεοπλασματικά κύτταρα τη χαρακτηριστική ικανότητα για πολλαπλασιαστική σηματοδότηση. Ένας άλλος μηχανισμός, με τον οποίο συγκεκριμένα βακτήρια προάγουν την ογκογένεση, περιλαμβάνει βακτήρια που παράγουν βουτυρικό οξύ, το οποίο επάγει γηρασμένα επιθηλιακά και ινοβλαστικά κύτταρα. Τέλος, τα πολυμορφικά μικροβιώματα συμμετέχουν στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, μέσω παραγωγής “ανοσοτροποποιητικών” παραγόντων, που ενεργοποιούν αισθητήρες βλάβης στα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Συνοψίζοντας, τα πολυμορφικά μικροβιώματα σε φυσιολογικούς ιστούς, καθώς επίσης και αυτά που βρίσκονται μέσα σε συμπαγείς όγκους, αποτελούν ένα διακριτό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων. [22], [26]



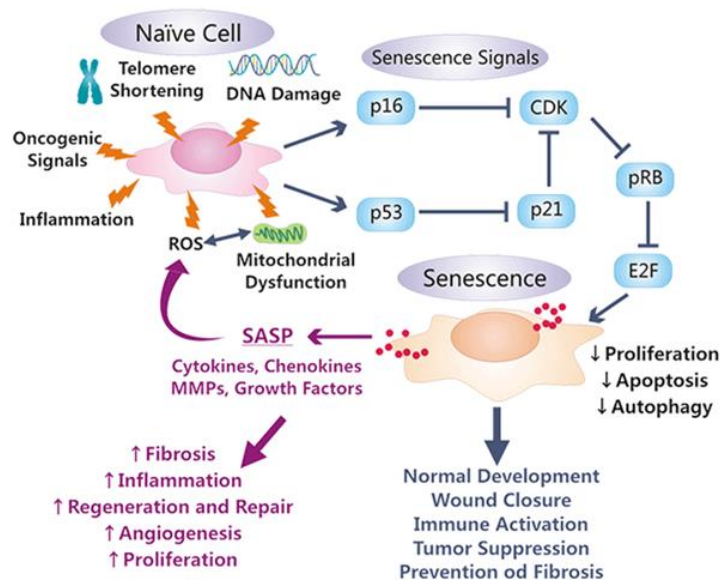
**Εικόνα 9.** Ο ρόλος του μικροβιώματος όγκου στην ανάπτυξη και θεραπεία του καρκίνου. Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί, με τους οποίους το μικροβίωμα του όγκου επηρεάζει την ογκογένεση, την εξέλιξη του καρκίνου και την ανταπόκριση σε θεραπευτικούς παράγοντες, περιλαμβάνουν αυξημένη μεταλλαξιogenese, ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με τον όγκο, τροποποίηση μονοπατιών ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή, μεταβολισμό αντικαρκινικών φαρμάκων, παραγωγή βακτηριακών τοξινών και μεταβολιτών. [26]

#### 1.2.14 Κυτταρική γήρανση

Η κυτταρική γήρανση αναφέρεται σε μια σταθερή και μη αναστρέψιμη κατάσταση διακοπής της κυτταρικής διαίρεσης, στην οποία τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα γίνονται ανθεκτικά σε ερεθίσματα, που προάγουν την ανάπτυξη, συνήθως ως απόκριση σε βλάβη του DNA. Η γήρανση περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Leonard Hayflick με την παρατήρηση, ότι οι ανθρώπινοι εμβρυϊκοί ινοβλάστες σταμάτησαν τελικά να διαιρούνται μετά από περίπου 50 κυτταρικούς κύκλους, αλλά παρέμειναν βιώσιμοι και μεταβολικά ενεργοί έπειτα από αρκετό χρόνο. Η κυτταρική γήρανση μπορεί να ειπωθεί, πως δρα ως συνεργατικός μηχανισμός στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Η γήρανση μπορεί να προκληθεί στα κύτταρα από μια ποικιλία συνθηκών, συμπεριλαμβανομένων του στρες, της στέρησης θρεπτικών ουσιών και της βλάβης του DNA, καθώς επίσης και της βλάβης στα οργανίδια και σε σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Για παράδειγμα, βλάβη στο DNA, αυξημένα επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου, ενεργοποίηση ογκογονιδίων (p53, Ras) και βράχυνση των τελομερών, πιστεύεται ότι συμβάλλουν στη διαδικασία της γήρανσης. Μολονότι, η κυτταρική γήρανση θεωρείται ως προστατευτικός μηχανισμός έναντι της ογκογένεσης, μια πληθώρα στοιχείων

αποκαλύπτει, ότι τα γηρασμένα κύτταρα διεγείρουν ποικιλοτρόπως την ανάπτυξη του όγκου και την κακοήγη εξέλιξη. Ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο τα γηρασμένα κύτταρα προάγουν φαινοτύπους, που σχετίζονται με όγκους, πιστεύεται ότι είναι το μονοπάτι SASP (Senescence Associated Secretory Phenotype), το οποίο είναι ικανό να απελευθερώσει, συνήθως με παρακρινή τρόπο, σηματοδοτικά μόρια και πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των χημειοκινών, κυτοκινών και πρωτεασών, στο περιβάλλον των καρκινικών κυττάρων. Η έκφραση του μονοπατιού αυτού επάγεται από έναν αριθμό μεταγραφικών παραγόντων, με πιο σημαντικό τον παράγοντα NF-κΒ (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). Έτσι, τα γηρασμένα καρκινικά κύτταρα συμβάλλουν στην πολλαπλασιαστική σηματοδότηση, αποφεύγοντας την απόπτωση, επάγοντας αγγειογένεση, διεγείροντας την εισβολή και τη μετάσταση, και καταστέλλοντας το ανοσοποιητικό σύστημα, που επιτίθεται στον όγκο.

Υπάρχουν πολλά αναφερόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία οδηγούν σε κυτταρική γήρανση, συμπεριλαμβανομένων των οδών p53 και p16<sup>Ink4a</sup>. Και τα δύο αυτά μονοπάτια ενεργοποιούνται ως απόκριση σε κυτταρικούς παράγοντες, που επιφέρουν οξειδωτικό στρες, και οδηγούν σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Αξίζει να σημειωθεί πως, τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν μεταλλαγμένη μία από αυτές τις δύο πρωτεΐνες, γεγονός που τους επιτρέπει να ξεφεύγουν από τη διαδικασία της γήρανσης. Εκτός από την πρωτεΐνη p16<sup>Ink4a</sup>, και η σχετιζόμενη με την γήρανση β-γαλακτοσιδάση, (SA-β-galactosidase), η οποία είναι μια υδρολάση που εντοπίζεται στα λυσοσώματα, αποτελεί έναν βιοδείκτη της κυτταρικής γήρανσης, καθώς συνήθως υπερεκφράζεται στα γηρασμένα κύτταρα. Αυτό βέβαια δεν είναι απόλυτο, μιας και υπάρχουν κύτταρα, που φυσιολογικά εκφράζουν το εν λόγω ένζυμο, όπως τα μακροφάγα. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί πως η σχέση γήρανσης-καρκίνου δεν περιορίζεται μόνο στα γηρασμένα καρκινικά κύτταρα, αλλά επεκτείνεται και σε κύτταρα, που βρίσκονται στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Συγκεκριμένα παραδείγματα αποτελούν, τα ινοβλαστικά κύτταρα, που σχετίζονται με όγκους, και κάποια ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία υφίστανται γήρανση και δύνανται να υποστηρίξουν, μέσω παρακρινούς σηματοδότησης, τον πολλαπλασιασμό, την εισβολή και μετάσταση καρκινικών κυττάρων. [22]



***Εικόνα 10.** Το γηρασμένο κύτταρο και η εμπλοκή του στην καρκινογένεση. Παρουσιάζονται τα βασικά σηματοδοτικά μονοπάτια, που εμπλέκονται στην προώθηση του φαινότυπου, που ευνοεί τα καρκινικά κύτταρα.*

### **1.3 Το μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων (Tumor MicroEnvironment, TME)**

Πέραν των βασικών χαρακτηριστικών, που διέπουν τα καρκινικά κύτταρα, το περιβάλλον τους αποτελεί ένα εξίσου σημαντικό ζήτημα, το οποίο χρήζει μελέτης. Θα πρέπει να διαπιστωθεί αφενός η συμβολή του στην ογκογένεση, και αφετέρου να αντληθούν περαιτέρω πληροφορίες, που θα συνδράμουν τόσο, στην κατανόηση της νόσου, όσο και στην ανάπτυξη θεραπευτικών μεθόδων.

Για να επιτευχθεί αυτό, πρέπει αρχικά να γίνει ξεκάθαρο, πως ο όγκος δεν συνίσταται μονάχα από καρκινικά κύτταρα, αλλά από μία πληθώρα άλλων κυττάρων, που συμβιώνουν με αυτά. Τα βασικά είδη κυττάρων, που συναντώνται στους όγκους και επηρεάζουν την εξέλιξή τους αναφέρονται παρακάτω, όπως επίσης και άλλες συνθήκες που επικρατούν στο καρκινικό μικροπεριβάλλον.

#### **1.3.1 Κύτταρα στο μικροπεριβάλλον του όγκου**

##### *1.3.1.1 Κύτταρα του ανοσοποιητικού*

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα T-κύτταρα, τα B-κύτταρα, τα μακροφάγα και τα NK-κύτταρα (Natural Killer cells), αποτελούν ένα βασικό συστατικό του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν αρκετοί διακριτοί πληθυσμοί T-κυττάρων, που επηρεάζουν την ογκογένεση. Τα κυτταροτοξικά T-κύτταρα (CD8+) ανιχνεύουν μη φυσιολογικά αντιγόνα, που εκφράζονται στον όγκο και στοχεύουν τα καρκινικά κύτταρα για να τα καταστρέψουν. Εκτός από τη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων, τα κυτταροτοξικά T-κύτταρα καταστέλλουν επίσης την αγγειογένεση, μέσω της έκκρισης γ-ιντερφερόνης (IFN-γ). Τα CD4+ T-κύτταρα συνήθως δρουν υποστηρικτικά για τα κύτταρα CD8+, μέσω της έκκρισης ιντερλευκίνης-2 (IL-2) και IFN-γ. Τα ρυθμιστικά T κύτταρα (Tregs) απαιτούνται κανονικά για την καταστολή των φλεγμονωδών αποκρίσεων και τον έλεγχο της ανοσίας. Στο πλαίσιο του καρκινικού περιβάλλοντος, τα Tregs είναι πανταχού παρόντα και προάγουν την ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου, μειώνοντας τις αντικαρκινικές ανοσολογικές αποκρίσεις. Για παράδειγμα, εκκρίνουν IL-2, που ρυθμίζει την ομοιόσταση και τη λειτουργία των κυττάρων NK. Επιπλέον, υποστηρίζουν άμεσα την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, μέσω της έκκρισης αυξητικών παραγόντων. Τα B-κύτταρα είναι εξειδικευμένα ανοσοκύτταρα υπεύθυνα για την παραγωγή αντισωμάτων και την έκκριση κυτοκινών, που προάγουν κυτταροτοξικές ανοσολογικές αποκρίσεις (π.χ. IFN-γ). Τυπικά, τα B-κύτταρα συγκεντρώνονται στο όριο των όγκων και βρίσκονται συνήθως σε λεμφαδένες σε κοντινή απόσταση από αυτούς. Πέραν των αντικαρκινικών τους ιδιοτήτων, τα B-κύτταρα προάγουν την επιθετικότητα του όγκου, μέσω της παραγωγής κυτοκινών (π.χ. IL-10 και μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα-βήτα (TGF-β)), που προάγουν ανοσοκατασταλτικούς φαινοτύπους. Επιπλέον, φυσικά κύτταρα δολοφόνοι κυκλοφορούν στην κυκλοφορία του αίματος και αναζητούν κύτταρα ξενιστές ή καρκινικά κύτταρα μολυσμένα από ιούς, ώστε να τα θανατώσουν. Τα κύτταρα NK είναι εξαιρετικά αποτελεσματικά στη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων εντός της κυκλοφορίας και μπορούν να συμμετέχουν στην παρεμπόδιση της μετάστασης, αλλά είναι λιγότερο αποτελεσματικά στη θανάτωση εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Τέλος, τα

μακροφάγα είναι ένα κρίσιμο συστατικό του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, που ρυθμίζει τις ανοσολογικές αποκρίσεις μέσω της φαγοκυττάρωσης του παθογόνου και της έκφρασης αντιγόνων στην επιφάνεια τους. Επιπλέον, τα μακροφάγα είναι κρίσιμα για την επούλωση πληγών και την επιδιόρθωση των ιστών. Τα μακροφάγα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν είτε σε φλεγμονώδη μακροφάγα M1, που φαγοκυτταρώνουν και σκοτώνουν τα κύτταρα, είτε σε αντιφλεγμονώδη μακροφάγα M2, που συμμετέχουν στην επούλωση του τραύματος. Ενώ και οι δύο κατηγορίες μακροφάγων μπορούν να βρεθούν μέσα σε έναν όγκο, το καρκινικό περιβάλλον προάγει τον φαινότυπο M2 μέσω της υποξίας και της έκκρισης κυτοκινών (π.χ. IL-4), με σκοπό την υποστήριξη της ανάπτυξης και της εξέλιξης του όγκου. Συχνά μακροφάγα βρίσκονται να περιβάλλουν τα αιμοφόρα αγγεία στο TME, όπου εκκρίνουν αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF)-A και επάγουν το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων. [27],[7]

#### *1.3.1.2 Στρωματικά κύτταρα*

Τα καρκινικά κύτταρα στρατολογούν υποστηρικτικά κύτταρα από κοντινά στρώματα του ενδογενούς ιστού, για να προωθήσουν τον σχηματισμό του όγκου. Η σύνθεση των στρωματικών κυττάρων μπορεί να ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων τύπων καρκίνου και περιλαμβάνει: αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, λιποκύτταρα και αστροκύτταρα. Μόλις βρεθούν στο μικροπεριβάλλον, τα στρωματικά κύτταρα εκκρίνουν πολλούς παράγοντες που επηρεάζουν την αγγειογένεση, τον πολλαπλασιασμό, την εισβολή και τη μετάσταση.

#### *1.3.1.3 Βλαστοκύτταρα*

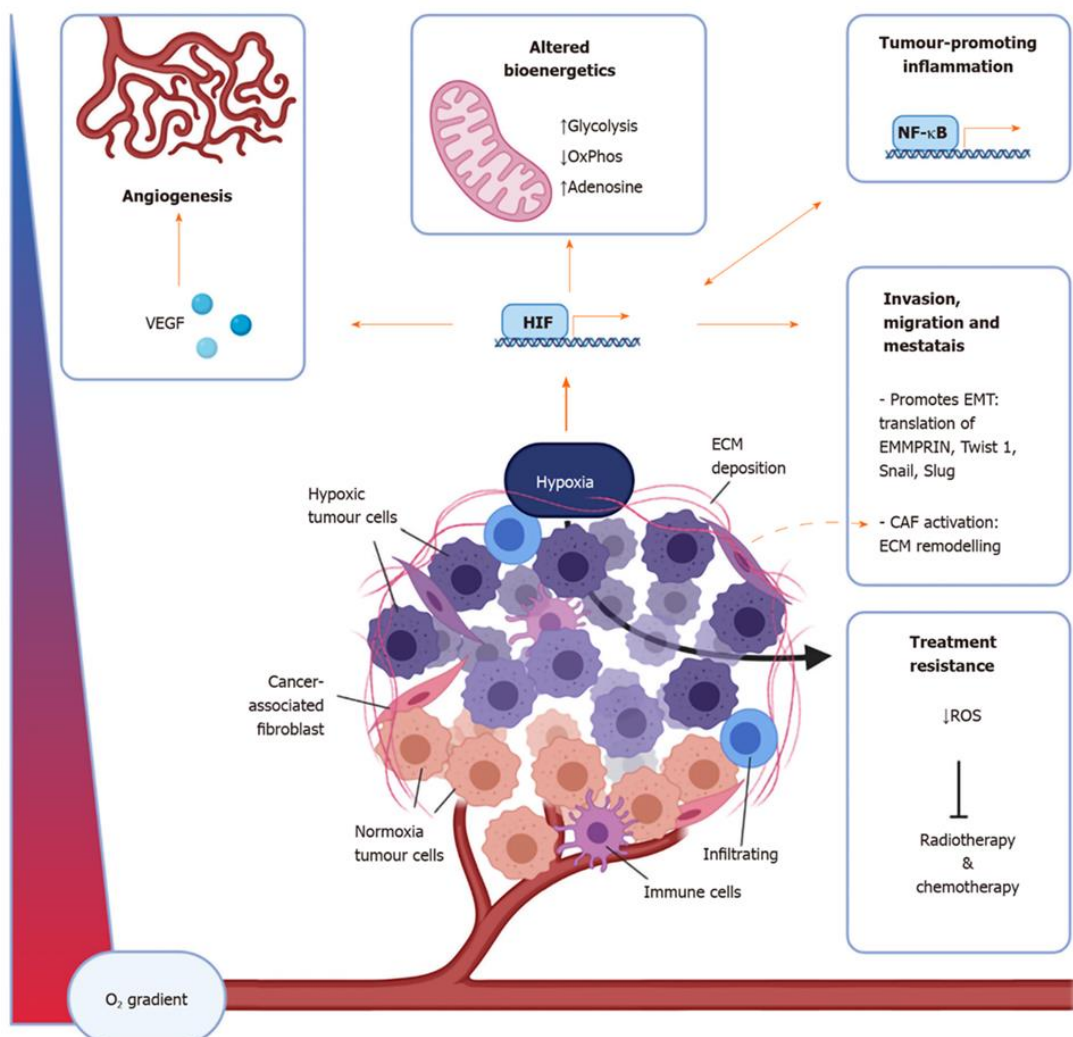
Τα βλαστοκύτταρα γενικά ορίζονται ως κλωνογονικά κύτταρα που είναι ικανά τόσο για αυτοανανέωση όσο και για διαφοροποίηση σε ώριμα κύτταρα για πολλές γενιές κυττάρων. Αποτελούν μονάδες βιολογικής οργάνωσης υπεύθυνες για την ανάπτυξη και την αναγέννηση ιστών και συστημάτων οργάνων. Ωστόσο, με γονιδιακές μεταλλάξεις ή υπό ορισμένες συνθήκες, αυτές οι διαδικασίες μπορεί να διαταραχθούν, οδηγώντας σε κακοήγη μετασχηματισμό των βλαστοκυττάρων. Αυτά τα κύτταρα στη συνέχεια γίνονται όλο και πιο επιθετικά και προσαρμόζονται σε μεγάλο βαθμό σε διάφορες συνθήκες, για παράδειγμα, αντικαρκινικές θεραπείες. Ωστόσο, παραμένει ασαφές εάν τα ίδια τα βλαστοκύτταρα γίνονται οδηγό της εξέλιξης του καρκίνου. [5], [19], [28]

### **1.3.2 Συνθήκες υποξίας**

Για τα κύτταρα των θηλαστικών, η διατήρηση της ομοιόστασης του οξυγόνου, ως ενεργειακού υποστρώματος για βασικές μεταβολικές αντιδράσεις, είναι υψίστης σημασίας. Το οξυγόνο μπορεί να διαχέεται μόνο 100 –180 nm από το άκρο του πλησιέστερου τριχοειδούς στα κύτταρα, προτού μεταβληθεί πλήρως. Ωστόσο, οι ταχέως αναπτυσσόμενοι όγκοι απομακρύνονται γρήγορα από την αγγειακή παροχή και, ως εκ τούτου, διαθέτουν ένα μικροπεριβάλλον, που χαρακτηρίζεται από υποξία, και έλλειψη θρεπτικών συστατικών. Για να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν σε αυτό το υποξικό μικροπεριβάλλον, τα καρκινικά κύτταρα επιλέγουν προσαρμοστικούς μηχανισμούς για να μεταβούν σε γλυκολυτικό μεταβολισμό, να προωθήσουν τον πολλαπλασιασμό, να γίνουν ανθεκτικά στην απόπτωση, να αποκτήσουν απεριόριστο δυναμικό αντιγραφής και γονιδιωματική αστάθεια, να αποφύγουν την επίθεση του ανοσοποιητικού, να προκαλέσουν αγγειογένεση και να μεταναστεύσουν σε λιγότερο υποξικές περιοχές του σώματος. Οι επαγόμενοι από την υποξία παράγοντες (Hypoxia Inducible Factors, HIFs) δραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στη



διατήρηση της ομοιόστασης του οξυγόνου στους οργανισμούς και μεσολαβούν κυρίως στις προσαρμοστικές αποκρίσεις σε μειωμένα επίπεδα οξυγόνου. Ο παράγοντας HIF αποτελείται από δύο υπομονάδες, HIF- $\alpha$  και HIF- $\beta$ . Οι υπομονάδες HIF- $\alpha$  των θηλαστικών κωδικοποιούνται από τρία γονίδια: HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  και HIF-3 $\alpha$ . Το HIF-1 $\alpha$  εκφράζεται παντού, ενώ τα HIF-2 $\alpha$  και HIF-3 $\alpha$  παρουσιάζουν πιο περιορισμένη κατανομή στους ιστούς. Το HIF-1, ένα ετεροδιμερές των HIF-1 $\alpha$  και HIF-1 $\beta$ , υπερεκφράζεται σε διάφορους ανθρώπινους καρκίνους και έχει αναγνωριστεί, ως ένας από τους κύριους ρυθμιστές της ομοιόστασης του οξυγόνου. Παρουσία O<sub>2</sub>, το HIF- $\alpha$  προορίζεται για αποικοδόμηση μέσω υδροξυλίωσης καταλυόμενη από ένζυμα. Όταν το επίπεδο οξυγόνου πέφτει, τα ένζυμα χάνουν τη δραστηριότητά τους, η υδροξυλίωση της υπομονάδας HIF- $\alpha$  αναστέλλεται και η αποικοδόμηση σταματά. Οι μη υδροξυλιωμένες, σταθεροποιημένες υπομονάδες HIF- $\alpha$  μετατοπίζονται στον πυρήνα, όπου διμερίζονται με την υπομονάδα HIF- $\beta$ , συνδέονται με το DNA και ξεκινούν τη γονιδιακή μεταγραφή παραγόντων, που σχετίζονται με την αγγειογένεση. Εκτός από την υποξία, η σταθεροποίηση και η δραστηριότητα του HIF- $\alpha$  ρυθμίζεται και από επιγενετικές αλλαγές και μεταλλάξεις, οι οποίες οδηγούν σε απώλεια ογκοκατασταλτικών λειτουργιών (ING4, p53, PTEN, VHL) και αύξηση των λειτουργιών ογκογονιδίων (Ras, Raf, mTOR και Myc). Συνοψίζοντας, οι κυτταρικές αποκρίσεις στην υποξία, που προκαλούνται από την υπερέκφραση των υπομονάδων HIF-1 $\alpha$  και HIF-2 $\alpha$ , αυξάνουν τον σχηματισμό αμοφόρων αγγείων, την επιθετικότητα, τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων και την αντίσταση στη θεραπεία. [29], [30]



*Εικόνα 11. Η υποξία και ο ρόλος της στη διαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος των καρκινικών κυττάρων, όπως επίσης και στην προώθηση της ανάπτυξης και επιβίωσης του όγκου. [31]*

### **1.3.3 Απορρύθμιση της τιμής pH του περιβάλλοντος του όγκου**

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων, αποτελεί ο αυξημένος ρυθμός γλυκόλυσης, που οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή και απέκκριση γαλακτικού οξέος, σε ένα φαινόμενο γνωστό ως φαινόμενο Warburg. Το γεγονός αυτό έχει άμεση επίδραση και στο pH των καρκινικών κυττάρων. Ενώ σε φυσιολογικά κύτταρα, το ενδοκυτταρικό pH ( $pH_{intracellular}$ ) είναι γενικά  $\sim 7,2$  και χαμηλότερο από το εξωκυτταρικό pH ( $pH_{extracellular}$ )  $\sim 7,4$ , τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν υψηλότερο ενδοκυτταρικό  $pH_i > 7,4$  και χαμηλότερο εξωκυτταρικό  $pH_e \sim 6,7-7,1$ . Παρατηρείται, δηλαδή, μια οξίνιση του εξωκυτταρικού pH στα καρκινικά κύτταρα. Επιπρόσθετα, τα καρκινικά κύτταρα συχνά εμφανίζουν αυξημένη έκφραση αντλιών πρωτονίων, όπως η  $H^+/K^+$  ΑΤΡάση, που μεταφέρει κατιόντα υδρογόνου στις κυτταρικές μεμβράνες και η καρβονική ανυδράση, η οποία συμμετέχει στην μετατροπή του  $CO_2$  σε ανθρακικά. Αυτές αποτελούν άλλους δύο παράγοντες, που συμβάλλουν στην οξίνιση του εξωκυτταρικού χώρου γύρω από τον όγκο. Οι όξινες συνθήκες στο μικροπεριβάλλον του όγκου μπορούν να προάγουν την εξέλιξη του καρκίνου, μέσω διαφόρων μηχανισμών. Το όξινο pH μπορεί να ενισχύσει την επεμβατικότητα και το μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων, καθώς και να συμβάλει στην αγγειογένεση. Επιπλέον, το όξινο περιβάλλον των όγκων μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα ορισμένων θεραπειών. Για παράδειγμα, το χαμηλό pH μπορεί να αλλάξει την πρόσληψη και την αποτελεσματικότητα των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, οδηγώντας σε μειωμένη ισχύ και αντίσταση του φαρμάκου. Επιπρόσθετα, αξίζει να αναφερθεί πως τα καρκινικά κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για να αισθάνονται και να ανταποκρίνονται στις μεταβολές του pH. Απορρύθμιση του, δύναται να ενεργοποιήσει συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια, που προάγουν την κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και την επεμβατικότητα. Αυτές οι οδοί περιλαμβάνουν τους καταρράκτες σηματοδότησης PI3K/AKT/mTOR και NF-κB.

Η κατανόηση της απορρύθμισης του pH στα καρκινικά κύτταρα είναι σημαντική για την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών, που εκμεταλλεύονται αυτό το χαρακτηριστικό. Ορισμένες πιθανές στρατηγικές περιλαμβάνουν τη ρύθμιση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου για εξουδετέρωση του όξινου pH ή την ανάπτυξη συστημάτων χορήγησης φαρμάκων, ευαίσθητων στο pH, για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας. [32], [33], [34]

### **1.3.4 Φαινόμενο αυξημένης διαπερατότητας και κατακράτησης**

Το φαινόμενο της αυξημένης διαπερατότητας και κατακράτησης (Enhanced Permeability and Retention, EPR effect) είναι ένα φαινόμενο, που παρατηρείται σε αρκετούς συμπαγείς όγκους. Έχουν μελετηθεί αρκετοί παράγοντες, που μπορεί να οδηγούν σε αυτό το φαινόμενο. Αρχικά, μπορεί να οφείλεται σε δομικές και λειτουργικές ανωμαλίες των αιμοφόρων αγγείων των όγκων, όπως σε διαρροές ή κενά μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και σε κακή λεμφική λειτουργία, γεγονός που με τη σειρά του μπορεί να προέρχεται από μαζική και ακανόνιστη αγγειογένεση. Άλλος ένας παράγοντας, που ενισχύει το φαινόμενο EPR, περιλαμβάνει την αυξημένη έκφραση φλεγμονωδών παραγόντων, όπως προσταγλανδίνες, βραδυκινίνη, μονοξειδίου του αζώτου, υπεροξυνιτρώδη, ιντερλευκίνες, πρωτεάσες, γ-ιντερφερόνη, VEGF και HIF-1 $\alpha$ . Λόγω της αυξημένης διαπερατότητας, διάφορα μακρομόρια,



όπως για παράδειγμα ναοσωματίδια, λιποσώματα και μικρού μοριακού βάρους φάρμακα, μπορούν να συσσωρευτούν παθητικά μέσα στον ιστό του όγκου. Αυτό συμβαίνει, επειδή το μέγεθος αυτών των σωματιδίων τα εμποδίζει να διαφύγουν εύκολα μέσω των αγγείων, ενώ συγχρόνως η ανεπαρκής παροχέτευση από το λεμφικό σύστημα εμποδίζει περαιτέρω την απέκκρισή τους από τον όγκο.

Το φαινόμενο EPR προσφέρει μια ευκαιρία για στοχευμένη χορήγηση φαρμάκου σε συμπαγείς όγκους. Φάρμακα ή φορείς φαρμάκων, εκμεταλλευόμενοι αυτό το φαινόμενο, μπορούν να συσσωρευτούν εκλεκτικά στον όγκο, ελαχιστοποιώντας παράλληλα την έκθεση του κυτταροτοξικού παράγοντα σε υγιείς ιστούς. Αυτό έχει αποτελέσει βάση για την ανάπτυξη συστημάτων χορήγησης φαρμάκων με βάση τα ναοσωματίδια. [35]

### 1.3.5 Δραστικές μορφές οξυγόνου

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species) αποτελούν ενεργά και δραστικά μόρια, που σχηματίζονται από το οξυγόνο ( $O_2$ ). Συνήθως είναι ρίζες, ιόντα ή μόρια, που διαθέτουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στοιβάδα ηλεκτρονίων τους. Τα ROS μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο ομάδες: ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και μη ριζικά ROS. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου περιλαμβάνουν το σουπεροξειδικό ανιόν ( $O_2^{\bullet-}$ ), τη ρίζα υδροξυλίου ( $\bullet OH$ ), το μονοξειδίο του αζώτου ( $NO^{\bullet}$ ), τις οργανικές ρίζες ( $R^{\bullet}$ ), τις ρίζες υπεροξυλίου ( $ROO^{\bullet}$ ), τις ρίζες αλκοξειδίου ( $RO^{\bullet}$ ), τις ρίζες θειωλίου ( $RS^{\bullet}$ ), ρίζες σουλφονυλίου ( $ROS^{\bullet}$ ), ρίζες θειωλ- υπεροξυλίου ( $RSOO^{\bullet}$ ) και δισουλφίδια. Τα μη ριζικά ROS περιλαμβάνουν το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), το μονήρες οξυγόνο ( $^1O_2$ ), το όζον ( $O_3$ ), τα οργανικά υδροϋπεροξειδία ( $ROOH$ ), τα υποχλωριώδη ( $HOCl$ ), το υπεροξυνιτρικό ( $ONO^{\bullet}$ ), το νιτροϋπεροξυανθρακικό ανιόν ( $O=NOOCO_2^-$ ), νιτροανθρακικό ανιόν ( $O_2NOCO_2^-$ ), διοξειδίο του διαζώτου ( $N_2O_2$ ), ιόν νιτρωνίου ( $NO_2^+$ ) και εξαιρετικά δραστικές ενώσεις καρβονυλίου, που προέρχονται από λιπίδια ή υδατάνθρακες. Μεταξύ αυτών, το σουπεροξειδικό ανιόν, το υπεροξειδίο του υδρογόνου και οι ρίζες υδροξυλίου είναι οι πιο συχνές ROS στον καρκίνο. Παράγονται ως φυσικά υποπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες, όπως η κυτταρική σηματοδότηση και η ομοιόσταση. Ωστόσο, όταν τα επίπεδα ROS υπερβαίνουν τα φυσιολογικά όρια και ξεφεύγουν από τους κυτταρικούς αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς, μπορεί να προκληθεί βλάβη στο DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια, λόγω ανάπτυξης οξειδωτικού στρες. [36]

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS διατηρούνται σταθερά, για να αποτραπεί η καταστροφή των κυττάρων. Η αποτοξίνωση από τα ROS επιτυγχάνεται από μη ενζυμικά μόρια (δηλαδή γλουταθειόνη, φλαβονοειδή και βιταμίνες A, C και E) ή μέσω αντιοξειδωτικών ενζύμων, που καταστρέφουν τα διαφορετικά είδη ROS. Ένα παράδειγμα αποτελούν οι δισμουτάσες σουπεροξειδίου (SOD), οι οποίες είναι μεταλλοένζυμα, που καταλύουν τη μετατροπή του ανιόντος σουπεροξειδίου σε οξυγόνο και υπεροξειδίο του υδρογόνου. Οι δισμουτάσες σουπεροξειδίου χρησιμοποιούν μεταλλικά ιόντα όπως χαλκό ( $Cu^{2+}$ ), ψευδάργυρο ( $Zn^{2+}$ ), μαγγάνιο ( $Mn^{2+}$ ) ή σίδηρο ( $Fe^{2+}$ ) ως συμπαραγόντες.

Άλλο ένα παράδειγμα, είναι το σύστημα της γλουταθειόνης και ενζύμων, όπως η αναγωγή της γλουταθειόνης και η υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Η γλουταθειόνη (πιο άφθονη θειόλη στη φύση), η οποία είναι ένα τριπεπτίδιο, που αποτελείται από γλουταμικό, κυστεΐνη και γλυκίνη, προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες, ανάγοντας τους δισουλφιδικούς δεσμούς των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών σε κυστεΐνες. Τα καρκινικά κύτταρα υπερεκφράζουν τη γλουταθειόνη και με αυτόν τον τρόπο γίνονται πιο ανθεκτικά σε

μεταβολές των επιπέδων ROS. Γενικά, η απορρύθμιση αυτών των αντιοξειδωτικών συστημάτων μπορεί να συμβάλει περαιτέρω στο οξειδωτικό στρες και να προάγει την εξέλιξη του καρκίνου.

Στα καρκινικά κύτταρα, τα υψηλά επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου μπορεί να προκύψουν από αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, δραστηριότητα υπεροξειωμάτων, αυξημένη σηματοδότηση κάποιου κυτταρικού υποδοχέα, αυξημένη δραστηριότητα ογκογονιδίου, αυξημένη δραστηριότητα οξειδασών, κυκλοοξυγενασών, λιποξυγενασών. Στα μιτοχόνδρια, τα ROS παράγονται ως αναπόφευκτο υποπροϊόν της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Συγκεκριμένα, μια ρίζα σουπεροξειδίου μπορεί να προκύψει από την ανεπιτυχή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό, και να απελευθερωθεί στον διαμεμβρανικό χώρο ή στην μιτοχονδριακή μήτρα. Το σουπεροξείδιο διασπάται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οποίο αποτελεί έναν δευτερεύων σηματοδοτικό αγγελιοφόρο, που μπορεί να διαχέεται μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Έτσι, ρυθμίζει τη δραστηριότητα πρωτεϊνών, όπως οι τυροσινικές κινάσες, φωσφατάσες, αλλά και διάφορων μεταγραφικών παραγόντων. Το γεγονός αυτό είναι πολύ κρίσιμο στην περίπτωση του καρκίνου, καθώς αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια ευαίσθητα σε μεταβολές των επιπέδων ROS, όπως αυτό της PI3K/Akt/mTOR, του NF-κB και των MAP κινασών, συμμετέχουν ενεργά στις διαδικασίες ογκογένεσης. [36][37]

Σε γενικές γραμμές, τα ROS εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, όπως επίσης και στις διαδικασίες της μετάστασης και της αγγειογένεσης, καθώς αποτελούν ρυθμιστές της έκφρασης πρωτεϊνών, που κατέχουν σημαντικό ρόλο σε αυτές. Στον αντίποδα όλων αυτών, το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από ROS μπορεί επίσης να έχει θεραπευτικές επιπτώσεις στη θεραπεία του καρκίνου. Ορισμένες θεραπείες καρκίνου, όπως η ακτινοθεραπεία και ορισμένα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, λειτουργούν αυξάνοντας τα επίπεδα ROS πέρα από το όριο των καρκινικών κυττάρων, προκαλώντας απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος). Αυτή η προσέγγιση εκμεταλλεύεται την εγγενή ευπάθεια των καρκινικών κυττάρων στην οξειδωτική βλάβη.

Συνοπτικά, τα ROS διαδραματίζουν πολύπλοκο ρόλο στον καρκίνο. Ενώ τα αυξημένα επίπεδα ROS μπορούν να συμβάλουν στην έναρξη και την εξέλιξη του καρκίνου, μπορούν επίσης να αξιοποιηθούν ως στόχοι για τη θεραπεία του καρκίνου. Η κατανόηση της περίπλοκης ισορροπίας των ROS και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών στα καρκινικά κύτταρα είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών. [18], [36], [37],[38]

### **1.3.6 Υπερέκφραση ενζύμων και υποδοχέων**

Τα ένζυμα διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου. Στον καρκίνο, ορισμένα ένζυμα μπορεί να υπερεκφραστούν, που σημαίνει ότι παράγονται σε μεγαλύτερες ποσότητες σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Αυτά τα υπερεκφρασμένα ένζυμα μπορούν να συμβάλουν στην ανάπτυξη του όγκου, την εισβολή και τη μετάσταση, και έχουν μελετηθεί εκτενώς ως βιοδείκτες για την ανίχνευση του καρκίνου, αλλά και ως πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι. Τα ένζυμα που υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ευρέως στις ακόλουθες κύριες ομάδες:

1. Γλυκολυτικά και μεταβολικά ένζυμα, που σχετίζονται με τον μεταβολισμό και μπορούν να ρυθμιστούν θετικά, για να καλύψουν τις ενεργειακές ανάγκες των καρκινικών κυττάρων. Κάποια από αυτά σχετίζονται με τον μεταβολισμό αμινοξέων, όπως η γλουταμινάση και άλλα με τον μεταβολισμό της γλυκόζης, όπως η εξοκινάση και η κινάση του πυροσταφυλικού και διάφορες αφυδρογονάσεις, οι οποίες συνιστούν ένζυμα τα οποία εμπλέκονται σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων. Παραδείγματα είναι η αφυδρογονάση του γαλακτικού και η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης. [39] Εκτός αυτών, ένα ένζυμο, που ήδη αναφέρθηκε για την δράση του και την συσχέτισή του με την καρκινογένεση, είναι η β-γαλακτοσιδάση, η οποία αποτελεί μία υδρολάση, που καταλύει την υδρόλυση του β-γλυκοσιδικού δεσμού, μετατρέποντας το μόριο της γαλακτόζης σε λακτόζη και γλυκόζη. [40], [41]

2. Κινάσες και φωσφατάσες, ένζυμα τα οποία προσθέτουν ή αφαιρούν μια φωσφορική ομάδα και μπορεί να υπερεκφράζονται ή να έχουν μεταλλαχθεί, οδηγώντας σε απορυθμισμένα μονοπάτια σηματοδότησης που προάγουν την κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση. Ένα πολύ σύνηθες παράδειγμα, αποτελεί η αλκαλική φωσφατάση, η οποία είναι υπεύθυνη για την υδρόλυση φωσφορικών μονοεστέρων υπό αλκαλικές συνθήκες.

3. Ένζυμα, που σχετίζονται με το DNA. Τα ένζυμα που εμπλέκονται στις τροποποιήσεις του DNA μπορούν να υπερεκφραστούν στο καρκινικό μικροπεριβάλλον, επηρεάζοντας τη σταθερότητα του γονιδιώματος και την έκφραση των γονιδίων. Παραδείγματα αποτελούν οι DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs), οι οποίες προσθέτουν μεθυλομάδες στο DNA και αποακετυλάσες ιστόνης (HDACs), οι οποίες αφαιρούν ακετυλομάδες από τις ιστόνες, οδηγώντας σε αλλοιωμένη έκφραση γονιδίων. Ένα ακόμα πολύ γνωστό παράδειγμα αποτελεί η τελομεράση, της οποίας η δράση έχει προαναφερθεί.

4. Εξωκυτταρικά ένζυμα. Συνήθως είναι μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυτταρικής μήτρας (MMPs), οι οποίες είναι μια οικογένεια ενζύμων, που αποικοδομούν συστατικά της εξωκυτταρικής μήτρας. Η υπερέκφραση ορισμένων MMPs, όπως η MMP-2 και MMP-9, έχει συσχετιστεί με τις διαδικασίες της αγγειογένεσης και μετάστασης.

5. Ένζυμα που εμπλέκονται σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και στον οξειδωτικό μεταβολισμό. Τέτοια ένζυμα συμβάλλουν σε διατάραξη της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας και στην ανάπτυξη καρκίνου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν, η οξειδάση του NADPH (NOX), η οποία παράγει δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), που εμπλέκονται στην εξέλιξη του καρκίνου και η νιτροαναγωγάση (Nitroreductase). Η τελευταία ανήκει στην οικογένεια των φλαβινοπρωτεϊνών και καταλύει την αντίδραση αναγωγής αρωματικών νιτρο-ενώσεων στις αντίστοιχες αμίνες τους. Οι νιτροαναγωγάσες αποτελούν ένζυμα, που συνήθως υπερεκφράζονται στους περισσότερους τύπους καρκίνου και για αυτό συνιστούν και έναν βιοδείκτη για την ανίχνευση του όγκου. [42]

### 1.3.7 Αύξηση του ιξώδους

Το ιξώδες ως θεμελιώδες φυσικό μέγεθος είναι το μέτρο αντίστασης ενός σώματος κατά την ροή του. Το ιξώδες, στο πλαίσιο των καρκινικών κυττάρων, αναφέρεται στην αντίσταση αυτών των κυττάρων στη ροή και εμπλέκεται σε αμέτρητες κυτταρικές διεργασίες, όπως η σύντηξη μεμβράνης, η διάχυση μεταβολιτών, η συσσώρευση πρωτεϊνών και η μεταγωγή σήματος. Είναι μια ιδιότητα που σχετίζεται με τη φυσική συμπεριφορά των κυττάρων, ιδιαίτερα την ικανότητά τους να παραμορφώνονται, να κινούνται και να μεταναστεύουν μέσω των ιστών. Το ιξώδες των καρκινικών κυττάρων επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των εγγενών ιδιοτήτων τους, των αλληλεπιδράσεων με την εξωκυτταρική μήτρα και της παρουσίας διαφορετικών μοριακών συστατικών μέσα στα κύτταρα. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να εμφανίσουν υψηλότερο ή χαμηλότερο ιξώδες

ανάλογα με τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου και το στάδιο του. Συνήθως αυξημένες τιμές ιξώδους μπορεί να οφείλονται σε αλλαγές στην κυτταροσκελετική τους οργάνωση, η οποία είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση του σχήματος των κυττάρων και την παροχή δομικής υποστήριξης. Αυτές οι αλλοιώσεις μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένη ακαμψία και παραμόρφωση των κυττάρων, οδηγώντας σε υψηλότερο ιξώδες. Επιπρόσθετα, τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να έχουν αλλοιωμένες ιδιότητες προσκόλλησης, επηρεάζοντας την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τα γειτονικά κύτταρα και την εξωκυτταρική μήτρα (ECM), γεγονός που οδηγεί σε αύξηση του ιξώδους. Άλλοι παράγοντες, που συνεπάγονται αυξημένο ιξώδες είναι η απορρύθμιση οδών σηματοδότησης, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει τις μηχανικές τους ιδιότητες, η αυξημένη κυτταροπλασματική πυκνότητα λόγω της συσσώρευσης πρωτεϊνών, λιπιδίων και άλλων κυτταρικών συστατικών, οι αλλαγές στη ρευστότητα των κυτταρικών μεμβρανών και των οργανιδίων και η αυξημένη παραγωγή και έκκριση συστατικών του μεταβολισμού, όπως το γαλακτικό οξύ. Η αύξηση του ιξώδους στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να συμβάλει στην διαδικασία μετάστασης με ποικίλους τρόπους. Το αυξημένο ιξώδες μπορεί να προάγει ισχυρότερη προσκόλληση μεταξύ των καρκινικών κυττάρων, επιτρέποντάς τους να σχηματίζουν συσσωματώματα, τα οποία είναι ανθεκτικότερα και μπορούν να επιβιώσουν και να μετακινηθούν αποτελεσματικότερα στην κυκλοφορία του αίματος. [43], [44]

Συνοψίζοντας, η μελέτη του ιξώδους των καρκινικών κυττάρων μπορεί να παρέχει πληροφορίες για τη συμπεριφορά τους και να συμβάλλει στην ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης τους. Για παράδειγμα, ορισμένοι ανιχνευτές φθορισμού έχουν αναπτυχθεί για να είναι ευαίσθητοι σε αλλαγές του ιξώδους. Αυτοί οι ανιχνευτές υφίστανται αλλαγές στις ιδιότητες φθορισμού τους, όπως η ένταση εκπομπής ή η διάρκεια ζωής, ως απόκριση σε διακυμάνσεις στο ιξώδες. Με την ενσωμάτωση αυτών των ανιχνευτών σε ένα δείγμα, οι αλλαγές στον φθορισμό μπορούν να συσχετιστούν με αλλαγές στο ιξώδες. Τέτοιοι ανιχνευτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες για τη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ του ιξώδους και των ιδιοτήτων των καρκινικών κυττάρων. [45], [46], [47]

## **1.4 Διάγνωση του καρκίνου**

Εκτός από την πρόληψη, μία από τις καλύτερες προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση του καρκίνου αποτελεί η έγκαιρη διάγνωση του. Υπάρχουν αρκετές τεχνικές ανίχνευσης αυτού, οι οποίες αναφέρονται παρακάτω.

### **1.4.1 Εργαστηριακές εξετάσεις**

Οι εργαστηριακές εξετάσεις μπορεί να περιλαμβάνουν αιματολογικές και βιοχημικές αναλύσεις διάφορων σωματικών υγρών. Οι εξετάσεις αίματος χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση ουσιών στο αίμα, που μπορεί να υποδεικνύουν την παρουσία καρκίνου ή να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την εξέλιξή του. Για παράδειγμα, οι καρκινικοί δείκτες είναι ουσίες που παράγονται από καρκινικά κύτταρα ή από τον ίδιο τον οργανισμό ως απόκριση στον καρκίνο. Τα αυξημένα επίπεδα συγκεκριμένων καρκινικών δεικτών μπορεί να υποδηλώνουν την παρουσία ορισμένων τύπων καρκίνου. Οι πιο γνωστοί καρκινικοί βιοδείκτες είναι το Ειδικό Προστατικό Αντιγόνο (PSA), η όξινη και η αλκαλική φωσφατάση, η χοριακή γοναδοτροπίνη (HCG), το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA), όπως επίσης και άλλα αντιγόνα.

### **1.4.2 Τεχνικές απεικόνισης**

Οι τεχνικές απεικόνισης χρησιμοποιούν διαφορετικές τεχνολογίες για τη δημιουργία λεπτομερών εικόνων του εσωτερικού του σώματος. Αυτές περιλαμβάνουν ακτινογραφίες, αξονική τομογραφία (CT), μαγνητική τομογραφία (MRI), τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET) και υπερηχογράφημα. Αυτές οι εξετάσεις μπορούν να βοηθήσουν στον εντοπισμό όγκων, στον προσδιορισμό του μεγέθους και της θέσης τους και στην αξιολόγηση εάν ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε άλλα μέρη του σώματος. Συγκεκριμένα, η ακτινογραφία μπορεί, θεωρητικά, να απεικονίσει οποιοδήποτε μέρος του σώματος. Χρησιμοποιούνται ακτίνες Χ, οι οποίες διαπερνούν τα πιο μαλακά μέρη του σώματος, ενώ αντίθετα η πορεία τους αποκόπτεται όταν συναντούν συμπαγή μέρη.

Άλλη μία μέθοδος είναι η αξονική τομογραφία, η οποία αποτελεί ακτινολογική μέθοδος με την οποία μπορεί να γίνει απεικόνιση σε κάθετες τομές ολόκληρου του σώματος, χρησιμοποιώντας ακτίνες Χ. Εκτός από τα πολλά πλεονεκτήματα, η αξονική τομογραφία έχει και κάποια μειονεκτήματα, όπως για παράδειγμα το ότι η ακτινοβολία που χρησιμοποιείται μπορεί να είναι επιβλαβής ή μεταλλαξιγόνα, και η εικόνα, που συλλέγεται είναι άκαμπτη και δεν απεικονίζει αποτελεσματικά τα μαλακά μέρη.

Τα μειονεκτήματα της αξονικής έρχεται να επιλύσει η μαγνητική τομογραφία (MRI). Η τεχνική αυτή βασίζεται στην εφαρμογή ισχυρού μαγνητικού πεδίου, υπό την επίδραση του οποίου, οι πυρήνες υδρογόνου των διάφορων συστατικών του ανθρώπινου σώματος προσανατολίζονται παράλληλα ως προς τις μαγνητικές γραμμές και περιστρέφονται γύρω από αυτές, με μια συχνότητα χαρακτηριστική για κάθε άτομο. Με την MRI είναι δυνατή η λήψη, τρισδιάστατων και υψηλής διακριτικότητας, πληροφοριών σχετικά με την βιοχημική κατάσταση των ιστών και έτσι υπάρχει η δυνατότητα του έγκαιρου εντοπισμού διαφόρων βιοχημικών αλλαγών, οι οποίες συμβαίνουν πριν το σχηματισμό κακοήθειας. Επιπλέον, η διαδικασία είναι ανώδυνη και δεν εκθέτει τον άνθρωπο σε ιονίζουσα ακτινοβολία. Το μειονέκτημα της εν λόγω μεθόδου είναι το κόστος και η πολυπλοκότητά της.

Εκτός της αξονικής και της μαγνητικής άλλη μία αρκετά εξελιγμένη τεχνική απεικόνισης είναι η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET). Σε αυτήν χρησιμοποιούνται ραδιενεργές ουσίες γνωστές ως ραδιενεργοί ανιχνευτές για την οπτικοποίηση και τη μέτρηση αλλαγών στις μεταβολικές διεργασίες και σε άλλες φυσιολογικές δραστηριότητες. Ουσιαστικά αποτελεί μια τεχνική σπινθηρογραφήματος, η οποία χρησιμοποιείται στην Ιατρική, κατά την οποία ένα ραδιοϊσότοπο συνδεδεμένο με ένα φάρμακο εγχέεται στο σώμα ως ιχνηθέτης. Όταν το ισότοπο υφίσταται διάσπαση εκπέμπεται ένα ποζιτρόνιο και όταν το ποζιτρόνιο συγκρούεται με ένα ηλεκτρόνιο, τα δύο σωματίδια αλληλοεξουδετερώνονται και εκπέμπονται ακτίνες γάμμα. Αυτές οι ακτίνες γάμμα ανιχνεύονται από κάμερες για να σχηματίσουν μια τρισδιάστατη εικόνα, με παρόμοιο τρόπο που λαμβάνεται μια εικόνα ακτίνων Χ.

### **1.4.3 Βιοψία**

Η βιοψία περιλαμβάνει την αφαίρεση ενός μικρού δείγματος ιστού ή κυττάρων από έναν ύποπτο όγκο. Στη συνέχεια, το δείγμα εξετάζεται σε μικροσκόπιο για να ελεγχθεί η παρουσία καρκινικών κυττάρων. Οι βιοψίες μπορούν να γίνουν χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές, συμπεριλαμβανομένων βιοψιών με βελόνα, χειρουργικές βιοψίες ή ενδοσκοπικές βιοψίες.

Όλες αυτές οι τεχνικές, που προαναφέρθηκαν είναι αρκετά διαδεδομένες και συνιστούν τις καλύτερες διαθέσιμες μεθόδους διάγνωσης του καρκίνου, που υπάρχουν μέχρι την δεδομένη στιγμή. Βέβαια είναι τεχνικές, που η καθεμία έχει και τα μειονεκτήματά της, όπως το υψηλό κόστος, η παρεμβατικότητα και οι παρενέργειες στην υγεία των ασθενών. Για

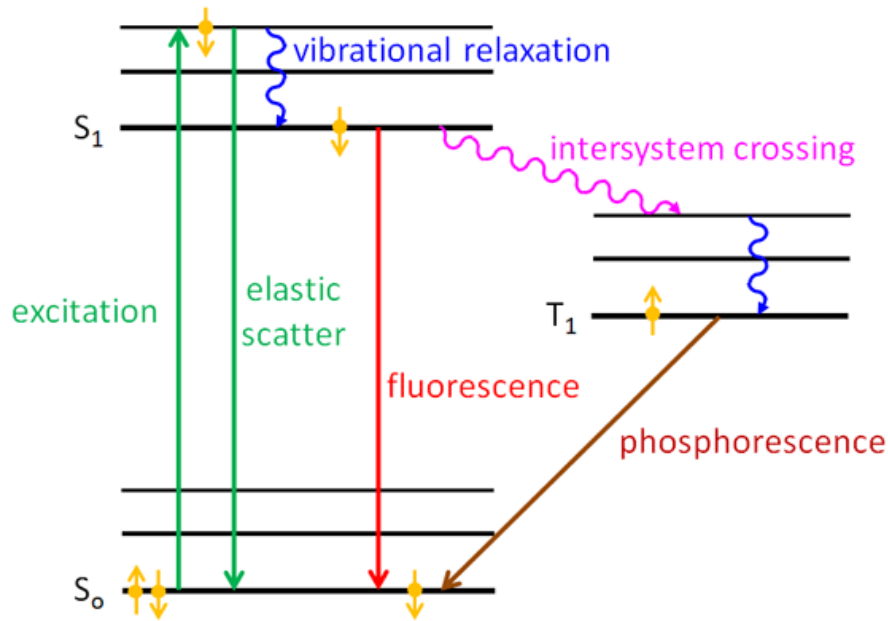
αυτόν τον λόγο η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει την προσοχή της και στην εύρεση νέων διαγνωστικών εργαλείων. Μερικά από αυτά στηρίζονται στην φωτοακουστική απεικόνιση (αλληλεπίδραση ακτινοβολίας με κάποιον ιστό προς παραγωγή ακουστικών κυμάτων), είτε στην απεικόνιση της φωταύγειας, δηλαδή της εκπομπής φωτός κατά την αποδιέγερση μιας ουσίας από μια διεγερμένη κατάσταση. Η μέθοδος απεικόνισης βασισμένη στην φωταύγεια είναι ιδιαιτέρως ενδιαφέρουσα και είναι και το αντικείμενο της εν λόγω διατριβής, καθώς παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με κάποιες από τις συμβατικές τεχνικές, όπως για παράδειγμα μη επεμβατικότητα, υψηλή χωροχρονική ανάλυση και χρήση μη ionίζουσας ακτινοβολίας. Πιο λεπτομερής ανάλυση της εν λόγω διαγνωστικής τεχνικής γίνεται παρακάτω.

#### 1.4.4 Τεχνικές απεικόνισης βασιζόμενες στον φθορισμό

Προκειμένου ένα μόριο να είναι διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση καρκίνου, θα πρέπει να αλληλεπιδρά με κάποιο χαρακτηριστικό του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και να δίνει ένα ανιχνεύσιμο σήμα. Στην περίπτωση της φωταύγειας, το μόριο πρέπει να απορροφά ακτινοβολία συγκεκριμένης ενέργειας, ώστε να κάνει τη μετάβαση από μία χαμηλότερη ενεργειακά στάθμη (E1) σε μία υψηλότερη ενεργειακά στάθμη (E2). Το φαινόμενο της απορρόφησης περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$E = \frac{h \cdot c}{\lambda}$ , όπου E είναι η ενέργεια της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που απορροφάται, h είναι η σταθερά του Planck, c είναι η ταχύτητα του φωτός και λ το μήκος κύματος. Στο πλαίσιο της διάγνωσης του καρκίνου, η προσοχή στρέφεται στην περιοχή 200-900 nm, η οποία χωρίζεται στο υπεριώδες (190-400 nm), το ορατό (400-800 nm) και το εγγύς υπέρυθρο (650-1700 nm). Η αντίστροφη διαδικασία από την απορρόφηση, δηλαδή η μετάβαση από την διεγερμένη στη θεμελιώδη κατάσταση, καλείται αποδιέγερση και μπορεί να γίνει είτε με εκπομπή φωτονίου, είτε με μεταφορά ενέργειας σε γειτονικά μόρια ή στο περιβάλλον. Λόγω αυτού ένα μέρος της ενέργειας αποδιέγερσης αφορά μη εκπομπή φωτονίου, με αποτέλεσμα η ενέργεια εκπομπής να είναι μικρότερη από αυτήν της απορρόφησης. Έτσι, το μήκος κύματος εκπομπής είναι μεγαλύτερο από το αντίστοιχο της διέγερσης. Η διαφορά αυτών των δύο ονομάζεται μετατόπιση Stokes.

Οι πιθανές διαγνωστικές ενώσεις, που θα αναλυθούν σε αυτήν τη διατριβή ανήκουν στην πρώτη περίπτωση (αποδιέγερση με εκπομπή φωτονίου-φωταύγεια). Η φωταύγεια είναι η εκπομπή φωτός από οποιαδήποτε ουσία και εμφανίζεται από ηλεκτρονικά διεγερμένες καταστάσεις. Η φωταύγεια χωρίζεται επίσημα σε δύο κατηγορίες, φθορισμό και φωσφορισμό, ανάλογα με τη φύση της διεγερμένης κατάστασης. Σε διεγερμένες απλές καταστάσεις, το ηλεκτρόνιο στο διεγερμένο τροχιακό ζευγαρώνεται (με αντίθετο spin) με το δεύτερο ηλεκτρόνιο στο τροχιακό της θεμελιώδους κατάστασης. Κατά συνέπεια, η επιστροφή στη θεμελιώδη κατάσταση επιτρέπεται και συμβαίνει γρήγορα με εκπομπή φωτονίου. Οι ρυθμοί εκπομπής του φθορισμού είναι συνήθως  $10^8 \text{ s}^{-1}$ , έτσι ώστε μια τυπική διάρκεια ζωής φθορισμού να είναι κοντά στα 10 ns ( $10 \times 10^{-9} \text{ s}$ ). Ο μηχανισμός της εκπομπής μέσω φθορισμού παρουσιάζεται στην **Εικόνα 12**.



**Εικόνα 12.** Διάγραμμα Jablonski, που παρουσιάζει τις βασικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά το φαινόμενο του φθορισμού και του φωσφορισμού.[48]

Αντίθετα, ο φωσφορισμός είναι εκπομπή φωτός από τριπλές διεγερμένες καταστάσεις (έπειτα από διασυστηματική διασταύρωση), στις οποίες το ηλεκτρόνιο στο διεγερμένο τροχιακό έχει τον ίδιο προσανατολισμό σπιν με το ηλεκτρόνιο της θεμελιώδους κατάστασης. Οι μεταβάσεις στη βασική κατάσταση απαγορεύονται και οι ρυθμοί εκπομπής είναι αργοί ( $10^3$  έως  $100 \text{ s}^{-1}$ ), έτσι ώστε οι διάρκειες ζωής φωσφορισμού να είναι τυπικά χιλιοστά του δευτερολέπτου έως δευτερόλεπτα.

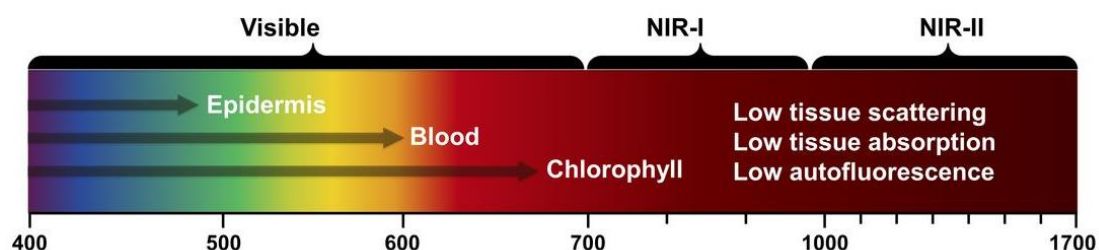
#### 1.4.4.1 Χρωστικές στην περιοχή του εγγύς υπέρυθρου (Near Infrared)

Η οπτική απεικόνιση και ανίχνευση καρκινικών κυττάρων, που βασίζεται σε χρωστικές του εγγύς υπέρυθρου αποτελεί μία τεχνική που φέρει αρκετά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με άλλες. Κάποια από αυτά είναι τα εξής:

- i) Βαθιά ιστική διείσδυση: Η ακτινοβολία NIR (εύρος 700-900 nm) έχει την ικανότητα να διεισδύει βαθύτερα στους βιολογικούς ιστούς σε σύγκριση με το ορατό φως. Αυτό επιτρέπει τη χρήση φθορίζουσών χρωστικών NIR σε τεχνικές απεικόνισης, που απαιτούν οπτικοποίηση δομών ή διεργασιών εντός ζωντανών οργανισμών, όπως η απεικόνιση in vivo και η ιατρική διάγνωση.
- ii) Μειωμένο φαινόμενο αυτοφθορισμού: Τα βιολογικά δείγματα συχνά εμφανίζουν αυτοφθορισμό, ο οποίος μπορεί να επηρεάσει την ακρίβεια και την ευαισθησία της απεικόνισης φθορισμού. Οι χρωστικές NIR είναι λιγότερο πιθανό να εμφανίσουν παρεμβολές από τον αυτοφθορισμό, οδηγώντας σε βελτιωμένες αναλογίες σήματος προς θόρυβο και πιο ακριβή αποτελέσματα απεικόνισης.
- iii) Ελάχιστη φθορά λόγω ακτινοβολίας: Η ακτινοβολία NIR έχει σχετικά χαμηλή ενέργεια σε σύγκριση με το υπεριώδες ή το ορατό φως. Αυτό μειώνει την πιθανότητα πρόκλησης σημαντικής βλάβης στους ζωντανούς ιστούς.

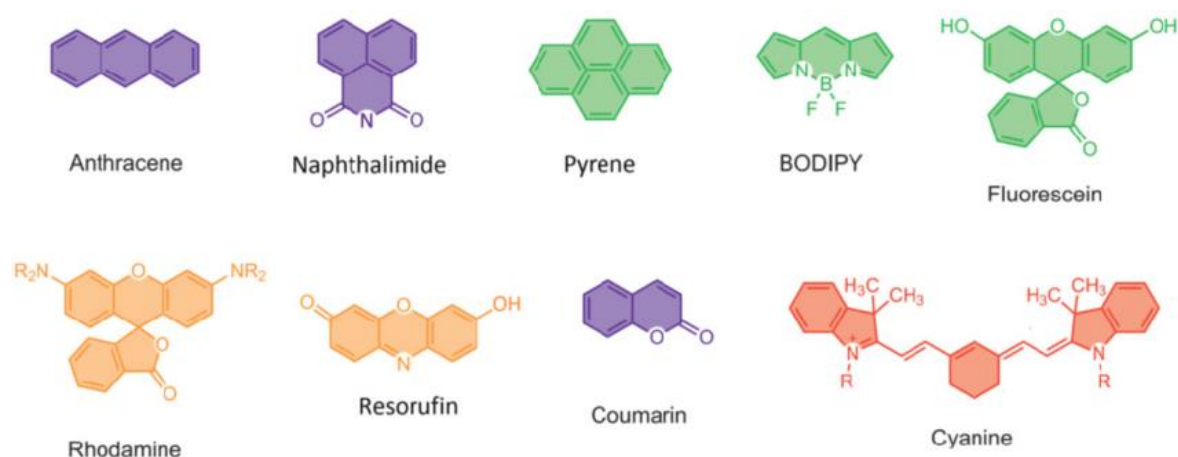
iv) Βιοσύζευξη και στόχευση: Οι φθορίζουσες χρωστικές NIR μπορούν εύκολα να συζευχθούν με βιομόρια όπως αντισώματα, πεπτίδια και νανοσωματίδια. Αυτό επιτρέπει τη συγκεκριμένη στόχευση συγκεκριμένων τύπων, μορίων ή δομών κυττάρων, καθιστώντας τα, πολύτιμα εργαλεία σε μελέτες μοριακής και κυτταρικής απεικόνισης.

v) Άλλα πλεονεκτήματα όπως, μη επεμβατική και ταχεία ανίχνευση, υψηλή χωρική ανάλυση, χαμηλό όριο ανίχνευσης και χαμηλό κόστος σε σχέση με συμβατικές τεχνικές. [49], [50]



**Εικόνα 13.** Η περιοχή NIR και τα πλεονεκτήματα των χρωστικών αυτής της περιοχής. [49]

Διατίθεται ένα ευρύ φάσμα φθορίζοντων χρωστικών NIR με ποικίλες χημικές δομές και ιδιότητες. Αυτή η ποικιλομορφία επιτρέπει στους ερευνητές να επιλέξουν αυτές που ταιριάζουν καλύτερα στις συγκεκριμένες πειραματικές τους ανάγκες.



**Εικόνα 14.** Οι βασικές κατηγορίες φθορίζοντων χρωστικών, που χρησιμοποιούνται για οπτική απεικόνιση σε διάφορες βιολογικές εφαρμογές. [51]

### 1.4.5 Μηχανισμοί Φθορισμού

Ο φθορισμός ως φαινόμενο εξαρτάται τόσο από τις επιδράσεις του περιβάλλοντος των χρωστικών ενώσεων, όσο επίσης και από τα φαινόμενα μεταφοράς φορτίου και ενέργειας κατά μήκος των μορίων.

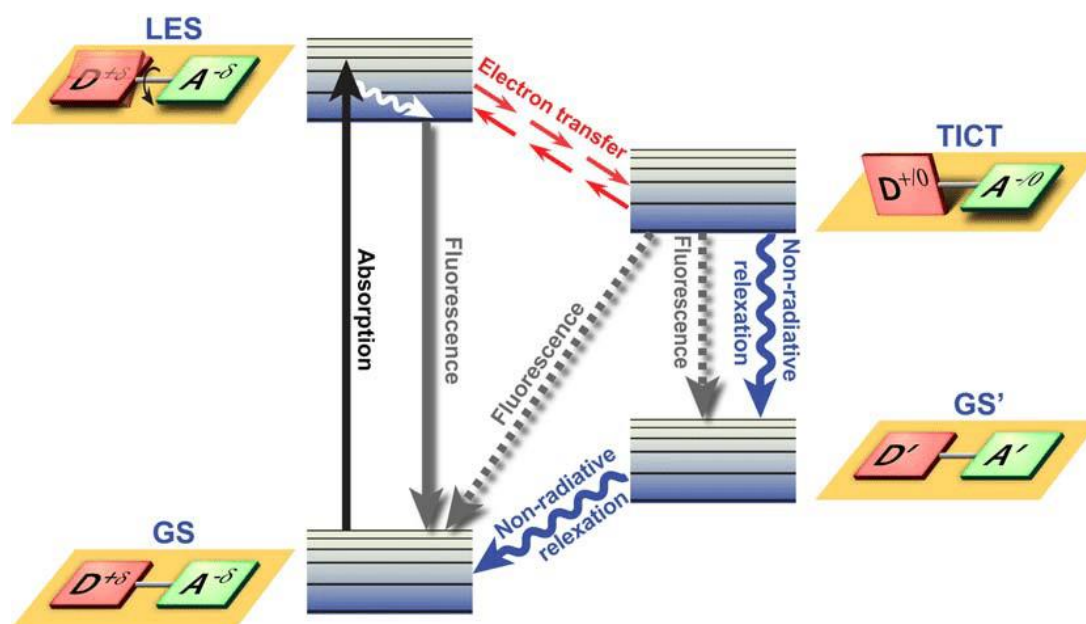
#### 1.4.5.1 Ενδομοριακή μεταφορά φορτίου (Intramolecular Charge Transfer, ICT)

Η διαδικασία μεταφοράς φορτίου μπορεί να χωριστεί σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Η μεταφορά φορτίου από ένα τμήμα του μορίου πλούσιο σε ηλεκτρόνια, σε ένα τμήμα φτωχό σε ηλεκτρόνια, που βρίσκεται σε διαφορετικό μόριο, είναι γνωστή ως διαδικασία διαμοριακής μεταφοράς φορτίου. Ωστόσο, εάν ο δότης και ο δέκτης ανήκουν στο ίδιο μόριο, το φαινόμενο ονομάζεται ενδομοριακή μεταφορά φορτίου (ICT). Το φαινόμενο ICT γενικά



συμβαίνει στη φωτοδιεγερμένη κατάσταση, στην οποία φθάνει ένα μόριο λόγω της απορρόφησης φωτός κατάλληλου μήκους κύματος. Η διέγερση διευκολύνει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το ένα μέρος ενός μορίου/ιόντος, στο άλλο τμήμα του στη διεγερμένη κατάσταση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η κατανομή του φορτίου στη διεγερμένη κατάσταση να διαφέρει σημαντικά από αυτή στη βασική κατάσταση. Συνήθως, το ICT φαινόμενο εμφανίζεται σε μόρια στα οποία ο δότης και οι ομάδες δέκτη συνδέονται μέσω ενός π-συζυγιακού συστήματος. Επιπλέον, η μεταφορά φορτίου μπορεί να γίνει είτε από ένα πραγματικό αρνητικό φορτίο, είτε από ένα ζεύγος ηλεκτρονίων του δότη. Οι χρωστικές αυτές, οι οποίες βασίζονται στο ICT φαινόμενο μεταξύ ενός δότη (D) και ενός δέκτη (A) ηλεκτρονίων, χαρακτηρίζονται και ως χρωστικές «ώθησης-έλξης».

Οι ιδιότητες των μορίων, που φθορίζουν μέσω του ICT φαινομένου, έχουν άμεση σχέση και με τις ιδιότητες του διαλύτη, όπως η πολικότητα. Συγκεκριμένα, ο επαγόμενος από ICT φθορισμός, χαρακτηρίζεται από αναδιοργανώσεις στη δομή, που επιτρέπουν στο μόριο να προσαρμοστεί σε νέες ηλεκτρονιακές καταστάσεις. Έτσι, η μεταφορά φορτίου μπορεί να επιτευχθεί και με διάφορες δομικές αναδιατάξεις. Διακρίνονται δύο κύριες υποκατηγορίες του ICT φαινομένου, η επίπεδη ενδομοριακή μεταφορά φορτίου (PICT, Planar Intramolecular Charge Transfer) και η συνεστραμμένη ενδομοριακή μεταφορά φορτίου (TICT, Twisted Intramolecular Charge Transfer). Το φαινόμενο TICT περιλαμβάνει τη μεταφορά φορτίου από ένα μέρος του μορίου σε άλλο, μέσω μιας συστροφής ή περιστροφής της μοριακής δομής. Το βασικό χαρακτηριστικό του TICT είναι η συστροφή ή η περιστροφή του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση. Αυτή η περιστροφική κίνηση συμβαίνει καθώς το μόριο προσπαθεί να βρει μια νέα διαμόρφωση, η οποία ελαχιστοποιεί την ενέργεια που σχετίζεται με την ανομοιόμορφη κατανομή των ηλεκτρονίων. Ως αποτέλεσμα, το μόριο υιοθετεί μια συνεστραμμένη ή παραμορφωμένη γεωμετρία στη διεγερμένη κατάσταση. Πιο απλά, αυτό που συμβαίνει είναι πως κατά τη διέγερση, η ένωση θα μεταβεί σε μια τοπικά διεγερμένη κατάσταση (Locally Excited), στην οποία υιοθετεί επίπεδη γεωμετρία και έπειτα για να σταθεροποιηθεί αυτή η κατάσταση, ο δότης ηλεκτρονίων στρέφεται σε κάθετη θέση. Το φαινόμενο ICT κατά τη διάρκεια αυτής της διεργασίας αυξάνεται και έτσι έχουμε την αποδιέγερση με φθορισμό. [52], [53], [54], [55][56]



Εικόνα 15. Ο μηχανισμός της συνεστραμμένης ενδομοριακής μεταφοράς φορτίου, TICT. [54]

Αξίζει να σημειωθεί πως ενώσεις, που παρουσιάζουν το φαινόμενο TICT έχουν ενδιαφέρον σε διάφορες εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένων ανιχνευτών φθορισμού και αισθητήρων. Η μοναδική τους συμπεριφορά μπορεί να αξιοποιηθεί για την ανίχνευση αλλαγών στο τοπικό τους περιβάλλον, όπως αλλαγές στην πολικότητα, το pH, ή το ιξώδες, καθιστώντας τες, πολύτιμα διαγνωστικά εργαλεία και στην περίπτωση του καρκίνου.

#### 1.4.5.2 Φωτοεπαγόμενη μεταφορά ηλεκτρονίων (PET, Photo-induced Electron Transfer)

Η φωτοεπαγόμενη μεταφορά ηλεκτρονίων (PET) είναι μια διεργασία μεταφοράς ηλεκτρονίων διεγερμένης κατάστασης, μέσω της οποίας ένα διεγερμένο ηλεκτρόνιο μεταφέρεται από ένα μόριο δότη, που βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση ( $S_1$  ή  $T_1$ ), σε ένα μόριο δέκτη, το οποίο συνήθως βρίσκεται στη θεμελιώδη κατάσταση. Εάν το μόριο-δέκτης είναι κοντά και έχει ένα κατάλληλο επίπεδο ενέργειας για να δεχτεί το ηλεκτρόνιο, το διεγερμένο ηλεκτρόνιο μπορεί να μεταφερθεί στον δέκτη, με επικάλυψη των τροχιακών τους, οδηγώντας στον σχηματισμό μιας κατάστασης διαχωρισμένου φορτίου. Στο PET, η μεταφορά ηλεκτρονίων από τη διεγερμένη κατάσταση του δότη στον δέκτη συχνά οδηγεί σε απόσβεση φθορισμού. Αυτό σημαίνει ότι η ενέργεια διεγερμένης κατάστασης εκτρέπεται μακριά από την εκπομπή φθορισμού, οδηγώντας σε μείωση της έντασης φθορισμού. Το PET μπορεί να είναι αναστρέψιμο ή μη αναστρέψιμο, ανάλογα με τα συγκεκριμένα μόρια και τις συνθήκες που εμπλέκονται. [57]

#### 1.4.5.3 Μεταφορά ενέργειας συντονισμού Förster (Förster Resonance Energy Transfer, FRET)

Το FRET είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο φαινόμενο στον φθορισμό, που επιτρέπει στους ερευνητές να μελετούν τις μοριακές αλληλεπιδράσεις, τις αποστάσεις και τις διαμορφωτικές αλλαγές στα βιολογικά και χημικά συστήματα. Το FRET βασίζεται στη μεταφορά ενέργειας χωρίς ακτινοβολία από ένα φθοροφόρο (δότη) σε ένα άλλο κοντινό φθοροφόρο (δέκτη), μέσω αλληλεπιδράσεων διπόλου-διπόλου. Συγκεκριμένα, το φαινόμενο FRET βασίζεται στην, εξαρτώμενη από την απόσταση, μεταφορά ενέργειας μεταξύ ενός δότη και ενός δέκτη. Εάν ο δέκτης βρίσκεται εντός ορισμένου εύρους απόστασης (συνήθως 1-10 nm) και σε κατάλληλο προσανατολισμό σε σχέση με τον δότη, η ενέργεια διεγερμένης κατάστασης από τον δότη μπορεί να μεταφερθεί στον δέκτη, μέσω ενός μηχανισμού σύζευξης διπόλου-διπόλου, χωρίς ακτινοβολία. Αυτή η μεταφορά ενέργειας οδηγεί στην αποδιέγερση του δότη και στη διέγερση του δέκτη. Ο δέκτης τότε εκπέμπει, φθορίζοντας στο χαρακτηριστικό του μήκος κύματος. Αξίζει επίσης να αναφερθεί, πως στο φαινόμενο FRET τα μόρια, που λειτουργούν ως δότες συνήθως εκπέμπουν σε μικρότερα μήκη κύματος, με αποτέλεσμα να υφίσταται επικάλυψη με το φάσμα απορρόφησης του δέκτη. Η απόδοση του φαινομένου αυτού εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες, όπως από την απόσταση δότη-δέκτη και την έκταση της επικάλυψης του φάσματος εκπομπής του δότη με το φάσμα απορρόφησης του δέκτη. [58], [59]

Εκτός από αυτούς τους βασικούς μηχανισμούς υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί μεταφοράς ενέργειας και φορτίου, με αποτέλεσμα τον φθορισμό μιας ένωσης. Παρόλα αυτά, αυτοί είναι οι κύριοι μηχανισμοί, τους οποίους εκμεταλλεύονται οι επιστήμονες για να αναπτύξουν έξυπνα εργαλεία ανίχνευσης και μελέτης του περιβάλλοντος μιας χρωστικής ένωσης-αισθητήρα.

## 1.5 Θεραπεία του καρκίνου

Στη σημερινή εποχή υφίστανται αρκετές διαφορετικές μέθοδοι και προσεγγίσεις για τη διαχείριση και καταπολέμηση του καρκίνου. Η επιλογή της θεραπείας εξαρτάται τόσο από

τον τύπο και το στάδιο του καρκίνου, καθώς και από τη συνολική υγεία του ασθενούς. Κάποιες από τις θεραπευτικές προσεγγίσεις παρουσιάζονται παρακάτω και είναι οι εξής:

**Α) Χειρουργική επέμβαση**, με στόχο την αφαίρεση των καρκινικών όγκων και των γύρω ιστών.

**Β) Χημειοθεραπεία**, στην οποία γίνεται χρήση φαρμάκων για να θανατωθούν τα καρκινικά κύτταρα ή για να επιβραδυνθεί η ανάπτυξή τους.

**Γ) Ακτινοθεραπεία**, στην οποία γίνεται χρήση υψηλών δόσεων για να επιτευχθεί βλάβη και θανάτωση των καρκινικών κυττάρων.

**Δ) Ανοσοθεραπεία**, η οποία έχει ως στόχο την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού στην προσπάθεια καταπολέμησης του καρκίνου.

**Ε) Στοχευμένη θεραπεία**, η οποία στοχεύει σε συγκεκριμένα μόρια, τα οποία εμπλέκονται στην ανάπτυξη του καρκίνου. Χρησιμοποιείται όταν τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, τα οποία μπορούν να στοχοποιηθούν χωρίς να προκληθεί βλάβη στα φυσιολογικά κύτταρα.

**ΣΤ) Ορμονοθεραπεία**, στόχος της οποίας είναι η αναστολή της ανάπτυξης όγκων ευαίσθητων σε ορμόνες, όπως ο καρκίνος του μαστού και του προστάτη.

**Ζ) Φωτοδυναμική θεραπεία**, η οποία χρησιμοποιεί ενώσεις-φωτοευαίσθητοποιητές, οι οποίες με ακτινοβολία με φως συνήθως παράγουν δραστικές μορφές οξυγόνου, που προκαλούν θανάτωση των καρκινικών κυττάρων.

Από όλες αυτές τις κατηγορίες που αναφέρθηκαν αυτή που εμφανίζει περισσότερο ενδιαφέρον από άποψη οργανικής χημείας, είναι η χημειοθεραπεία, λόγω της προσπάθειας σύνθεσης νέων ή της καλύτερης αξιοποίησης ήδη υπαρχόντων, χημειοθεραπευτικών ενώσεων-φαρμάκων. Έτσι, θα δώσουμε έμφαση στις βασικές κατηγορίες φαρμάκων έναντι του καρκίνου, καθώς επίσης και στις βασικές αρχές ανάπτυξης θεραπευτικών ενώσεων.

### 1.5.1 Αντικαρκινικά φάρμακα

Τα αντικαρκινικά φάρμακα είναι φάρμακα, που έχουν σχεδιαστεί για τη θεραπεία και τη διαχείριση του καρκίνου αναστέλλοντας την ανάπτυξη και τη διαίρεση των καρκινικών κυττάρων. Αυτά τα φάρμακα μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες κατηγορίες με βάση τους μηχανισμούς δράσης τους και τις συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου που στοχεύουν.

i) **Αλκυλιωτικοί παράγοντες**, οι οποίοι παρεμβαίνουν στη δομή του DNA, αποτρέποντας τη διαίρεση των καρκινικών κυττάρων (π.χ. κυκλοφωσφαμίδη, cis-platin, carbo-platin, βουσουλφάνη).

ii) **Αντιμεταβολίτες**, οι οποίοι διαταράσσουν τη σύνθεση του DNA, μιμούμενοι τις φυσιολογικές ουσίες που απαιτούνται για την κυτταρική διαίρεση (π.χ. μεθοτρεξάτη, 5-φθοροουρακίλη, καπεσιταβίνη, γεμισιταβίνη).

iii) **Αντικαρκινικά αντιβιοτικά**, τα οποία παρεμβαίνουν στο DNA, με το να δεσμεύονται σε αυτό, είτε αναστέλλοντας ένζυμα που εμπλέκονται στην αντιγραφή του (π.χ. δοξορουβικίνη, δαουνορουβικίνη, μπλεομυκίνη).

iv) **Αναστολείς τοποϊσομερασών**, τα οποία είναι ένζυμα που εμπλέκονται στην αντιγραφή και την επιδιόρθωση του DNA (π.χ. τοποτεκάνη, ετοποσίδη).

v) **Αναστολείς της μίτωσης** (π.χ. πακλιταξέλη, δοσεταξέλη, βινβλαστίνη).

vi) **Αναστολείς πρωτεασώματος**, οι οποίοι ανακόπτουν τη δράση του πρωτεασώματος, οδηγώντας στη συσσώρευση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και ως ακόλουθο στην επαγωγή του κυτταρικού θανάτου (π.χ. βορτεζομίμη).

vii) **Αναστολείς τυροσινικών κινασών**, ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στη σηματοδότηση των καρκινικών κυττάρων (π.χ. ιματινίμη, ερλοτινίμη).

Μολονότι υπάρχουν αρκετά χημειοθεραπευτικά φάρμακα, υπάρχουν και αρκετά εμπόδια, που αποτρέπουν την αποτελεσματική δράση έναντι του καρκίνου. Τα κύρια προβλήματα, που εμφανίζονται κατά τη χημειοθεραπεία, κυρίως αφορούν την μη ειδική και εκλεκτική κατανομή των αντικαρκινικών παραγόντων στους ιστούς, γεγονός που οδηγεί τόσο σε αναποτελεσματική συγκέντρωση του θεραπευτικού μέσου στην περιοχή του όγκου, όσο και σε εμφάνιση παρενεργειών και κυτταροτοξική δράση των φαρμάκων έναντι και υγιών κυττάρων. Άλλο ένα βασικό μειονέκτημα προκύπτει από την αντοχή και την αντίσταση που εμφανίζουν τα καρκινικά κύτταρα έναντι των φαρμάκων, γεγονός που οδηγεί σε ανεπαρκή καταπολέμηση του όγκου. Με σκοπό να υπερνικηθούν αυτά τα εμπόδια γίνεται η προσπάθεια ανάπτυξης ενώσεων που να μπορούν να κατευθύνουν εκλεκτικά κάποιον κυτταροτοξικό παράγοντα στα καρκινικά κύτταρα, στα πλαίσια μιας πιο στοχευμένης χημειοθεραπείας. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα προφάρμακα, τα οποία αποτελούν χημικά τροποποιημένα και βιολογικά αδρανή παράγωγα μικρών μορίων, τα οποία ανταποκρίνονται στα διάφορα ερεθίσματα του περιβάλλοντος των καρκινικών κυττάρων, και απελευθερώνουν το ενεργό φάρμακο. [60][61]

### 1.5.2 Στρατηγικές σύνθεσης θεραπευτικών ενώσεων-προφαρμάκων

Όπως ήδη αναφέρθηκε, εκτός της θεραπείας, είναι μεγίστης σημασίας και η έγκαιρη ανίχνευση και διάγνωση των καρκινικών κυττάρων. Η ανάπτυξη θεραπευτικών περιλαμβάνει την ενσωμάτωση τόσο θεραπευτικών, όσο και διαγνωστικών ενώσεων, σε ένα ενιαίο μόριο με στόχο την παροχή εξατομικευμένης και στοχευμένης θεραπείας για διάφορες ασθένειες, όπως ο καρκίνος. Μολονότι τα κομμάτια από τα οποία απαρτίζεται ένα θεραπευτικό μόριο μπορεί να ποικίλλουν, υπάρχουν κάποιες βασικές αρχές που ακολουθούνται για τη σύνθεσή τους. Αρχικά σε μία τέτοια ένωση θα πρέπει να υπάρχει:

A) Ένα **διαγνωστικό τμήμα**, το οποίο συνήθως είναι ένας **παράγοντας απεικόνισης**, ο οποίος επιτρέπει τη μη επεμβατική απεικόνιση του καρκινικού ιστού. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, εκτός των τεχνικών όπως, η τομογραφία PET ή MRI, η οπτική απεικόνιση με χρήση χρωστικών στην περιοχή του εγγύς υπερύθρου είναι αρκετά ενδιαφέρουσα. [62][63]

B) Ένα **θεραπευτικό τμήμα**, το οποίο είναι το μοναδικό συστατικό ενός θεραπευτικού, που να ασκεί επίδραση στα καρκινικά κύτταρα. Αυτό μπορεί να είναι **κυτταροτοξικό φάρμακο**, ένα ραδιενεργό ισότοπο για στοχευμένη ακτινοθεραπεία ή άλλος θεραπευτικός παράγοντας. Η επιλογή του θεραπευτικού συστατικού εξαρτάται από τον τύπο του καρκίνου και την επιθυμητή θεραπευτική στρατηγική.

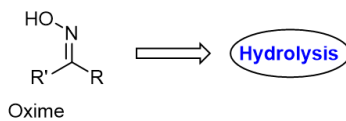
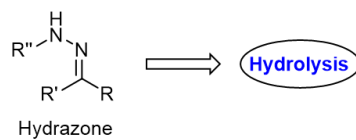
Γ) Ένα **τμήμα στόχευσης**, το οποίο ενσωματώνεται με στόχο την ενίσχυση της εκλεκτικότητας του θεραπευτικού μορίου στα καρκινικά κύτταρα. Αυτά τα τμήματα συχνά είναι αντισώματα, πεπτιδία ή μικρά οργανικά μόρια, τα οποία ανταποκρίνονται είτε σε κάποια συνθήκη, που

διαφοροποιεί τα υγιή με τα καρκινικά κύτταρα (pH, ιξώδες) ή σε κάποιον παράγοντα, που υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα (ένζυμα, υποδοχείς).

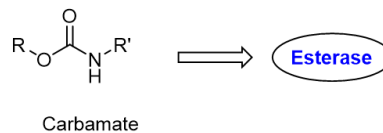
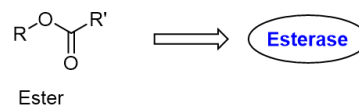
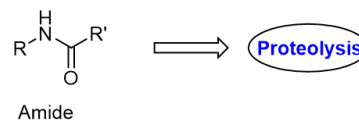
Δ) Ένας **συνδέτης**, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη σύνδεση του διαγνωστικού και του θεραπευτικού παράγοντα με το τμήμα στόχευσης. Διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του θεραπευτικού μορίου και στη διασφάλιση της σωστής παράδοσής του στο σημείο στόχο. Για παράδειγμα, είναι απαραίτητη η σταθερότητα στην κυκλοφορία του αίματος προς αποφυγή της πρόωρης και μη ειδικής απελευθέρωσης του φαρμάκου. Σύμφωνα με τη σταθερότητά τους, τις λειτουργικές ομάδες και τον μηχανισμό απελευθέρωσης, οι συνδέτες διακρίνονται συνήθως σε δύο γενικές κατηγορίες: τους διασπώμενους και τους μη διασπώμενους συνδέτες. Σε αρκετά θεραπευτογνωστικά μόρια επιλέγονται οι διασπώμενοι συνδέτες. Αυτοί οι συνδέτες μπορεί να είναι ευαίσθητοι σε συγκεκριμένα ένζυμα, που υπάρχουν στο μικροπεριβάλλον του όγκου ή σε αλλαγές του pH, επιτρέποντας την επιλεκτική απελευθέρωση του θεραπευτικού φαρμάκου. [64][65]

### Cleavable Linkers

pH sensitive linkers/Cleavage in Endosome/Lysosome



Enzyme-sensitive linkers/Cleavage in Endosome/Lysosome

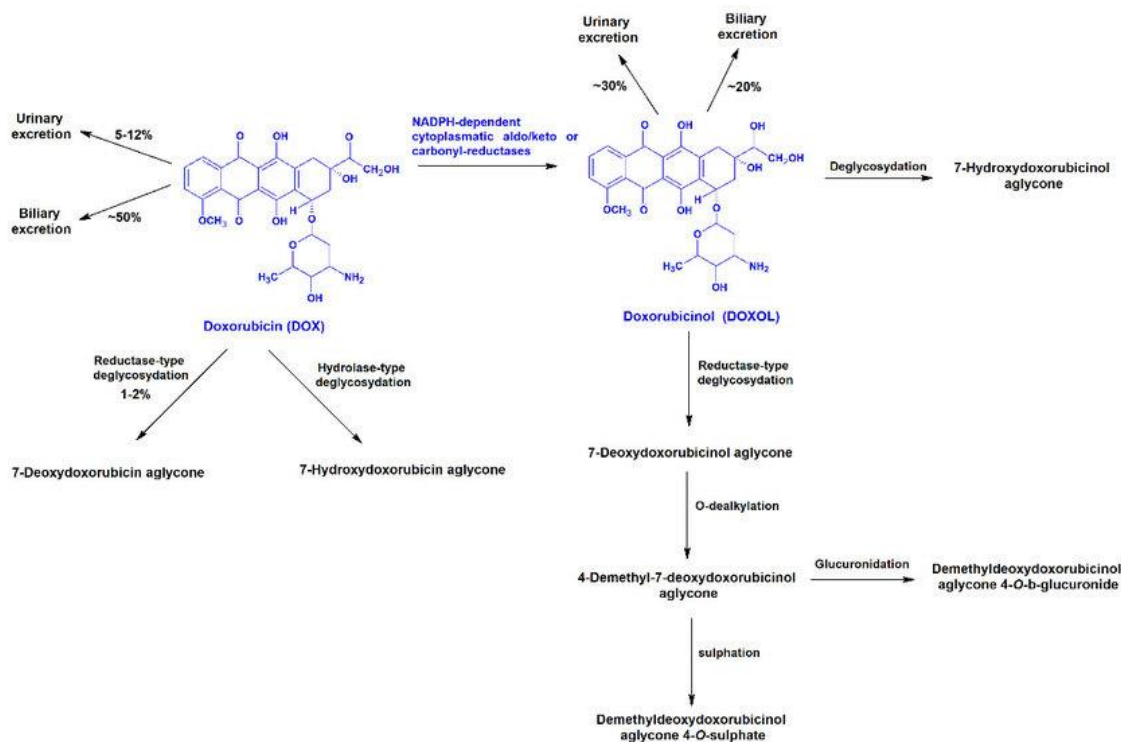


**Εικόνα 16.** Κατηγοριοποίηση των κύριων διασπώμενων συνδετών, που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη θεραπευτογνωστικών ενώσεων έναντι του καρκίνου.

### 1.5.3 Η δοξορουβικίνη ως αντικαρκινικό φάρμακο

Η δοξορουβικίνη είναι ένα χημειοθεραπευτικό φάρμακο, που ανήκει σε μια κατηγορία φαρμάκων, γνωστών ως ανθρακυκλίνες. Χρησιμοποιείται ευρέως στη θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, του καρκίνου του πνεύμονα, του καρκίνου των ωθηκών και της λευχαιμίας. Η δοξορουβικίνη δρα παρεμβαίνοντας στο DNA των καρκινικών κυττάρων, εμποδίζοντας την ανάπτυξη και τη διαίρεση τους. Η ένωση αυτή διαθέτει τμήματα σακχάρου και αγλυκόνης. Σχετικά με τον μεταβολισμό και την απέκκρισή της, η δοξορουβικίνη μεταβολίζεται κυρίως στο ήπαρ. Το φάρμακο υφίσταται αναγωγή από ένζυμα, κυρίως από εκείνα που ανήκουν στην οικογένεια του κυτοχρώματος P450 (CYP), για να σχηματίσει έναν κύριο μεταβολίτη, που ονομάζεται δοξορουβικινόλη. Η δοξορουβικινόλη θεωρείται ο κύριος ενεργός μεταβολίτης και διατηρεί μερική κυτταροτοξική δράση κατά των καρκινικών κυττάρων. Αυτός ο μεταβολίτης είναι λιγότερο λιπόφιλος από το μητρικό φάρμακο και ο

σχηματισμός του θεωρείται ότι συμβάλλει στη συνολική τοξικότητα της δοξορουβικίνης. Όπως παρουσιάζεται και στην **Εικόνα 17**, για να μεταβολιστούν τόσο η δοξορουβικίνη όσο και η δοξορουβικινόλη, πρέπει και οι δύο να υποβληθούν σε μια σειρά αντιδράσεων, όπως υδρολυτική γλυκοσιδική και αναγωγική διάσπαση, O-θειώση, O-απομεθυλίωση και O-γλυκουρονίωση. Η δομή σακχάρου τόσο της δοξορουβικίνης όσο και της δοξορουβικινόλης εξαλείφεται όταν οι γλυκοσιδικοί δεσμοί υποβάλλονται σε υδρόλυση, καταλυόμενη από οξύ. Η υδρόλυση του γλυκοσιδικού δεσμού προκαλεί την παραγωγή της δοξορουβικινόνης από τη δοξορουβικίνη και της δοξορουβικινολόνης από τη δοξορουβικινόλη. Ο χρόνος ημιζωής της δοξορουβικίνης είναι σχετικά σύντομος, αλλά ο μεταβολίτης δοξορουβικινόλη έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής. [66][67][68]



**Εικόνα 17.** Σχηματική αναπαράσταση των μεταβολικών μονοπατιών, που περιλαμβάνονται στη διαδικασία απέκκρισης της δοξορουβικίνης. [69]

Οι μηχανισμοί δράσης της δοξορουβικίνης περιλαμβάνουν την αλληλεπίδρασή με το DNA και την παρέμβαση σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες.

A) Παρεμβολή στο DNA: Οι επίπεδοι αρωματικοί και οι ετεροαρωματικοί δακτύλιοι, που υπάρχουν στην ένωση, παρεμβάλλονται μεταξύ των γειτονικών ζευγών βάσεων DNA, μέσω ομοιοπολικής και μη ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης. Αυτό διαταράσσει την κανονική δομή της διπλής έλικας του DNA και παρεμποδίζει την αντιγραφή και τη μεταγραφή του.

B) Αναστολή της Τοποϊσομεράσης II: Η δοξορουβικίνη αναστέλλει τη δραστηριότητα ενός ενζύμου που ονομάζεται τοποϊσομεράση II. Αυτό το ένζυμο εμπλέκεται στη ρύθμιση της τοπολογίας του DNA προκαλώντας παροδικές θραύσεις στους κλώνους του DNA, επιτρέποντας το ξετύλιγμα και το τύλιγμα κατά τη διάρκεια διεργασιών, όπως η αντιγραφή και η μεταγραφή. Η δοξορουβικίνη σταθεροποιεί το σύμπλοκο που σχηματίζεται από την τοποϊσομεράση II και το DNA, οδηγώντας στη συσσώρευση θραύσεων του DNA. Έτσι, αναστέλλεται η σύνθεση νέων κλώνων DNA.

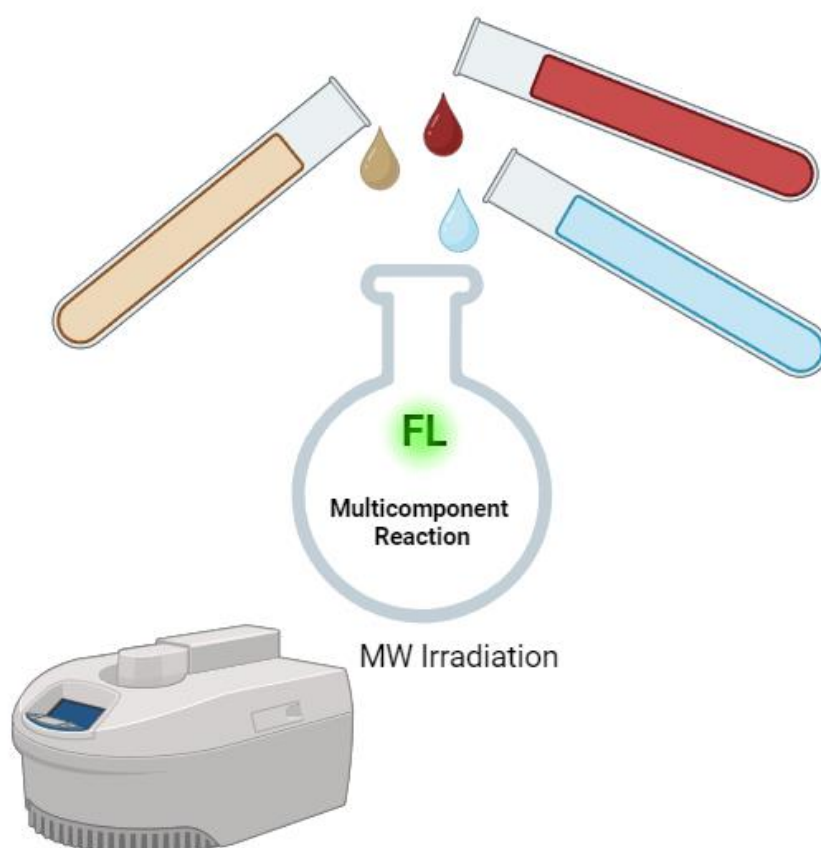
Γ) Παραγωγή ελευθέρων ριζών: Η δοξορουβικίνη μπορεί να υποβληθεί σε κύκλο οξειδοαναγωγής, οδηγώντας στη δημιουργία ελεύθερων ριζών, όπως οι ρίζες υπεροξειδίου και υδροξυλίου. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν περαιτέρω βλάβη σε κυτταρικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένου του DNA, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων. Το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τη δοξορουβικίνη συμβάλλει στις κυτταροτοξικές της επιδράσεις.

Μέσω αυτών των μηχανισμών δράσης, η δοξορουβικίνη παρεμβαίνει και μπορεί να διακόψει τον κυτταρικό κύκλο σε διάφορες φάσεις, αποτρέποντας τη διαίρεση και των πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Επιπρόσθετα, οι βλάβες στο DNA, που προκαλούνται από την δοξορουβικίνη, ενεργοποιούν τις κυτταρικές οδούς σηματοδότησης, οι οποίες οδηγούν σε απόπτωση.

Μολονότι, το φάρμακο αυτό έχει εκπληκτική δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων και θεωρείται ως ένα από τα ισχυρότερα όπλα στη "φαρέτρα" των επιστημόνων, διαθέτει και κάποια ισχυρά μειονεκτήματα. Η δοξορουβικίνη μπορεί να έχει σημαντικές παρενέργειες, όπως ναυτία, έμετο, απώλεια μαλλιών, κόπωση και μειωμένη ικανότητα του μυελού των οστών να παράγει κύτταρα αίματος. Μία από τις σημαντικές ανησυχίες σχετικά με τη χρήση δοξορουβικίνης είναι η πιθανότητα πρόκλησης καρδιακής βλάβης, ειδικά όταν χορηγείται σε υψηλές δόσεις ή για παρατεταμένες περιόδους. Ο ακριβής μηχανισμός της τοξικότητας στην καρδιά παραμένει αμφιλεγόμενος, με δύο θεωρίες να είναι οι επικρατέστερες, αυτή της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της οξείδωσης του σιδήρου και αυτή της μιτοχονδριακής διαταραχής και της επαγωγής της απόπτωσης. Πάντως αποτέλεσμα αυτών είναι η καταστροφή των καρδιακών κυττάρων, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε καρδιομυοπάθεια, καρδιακή αρρυθμία, μέχρι και καρδιακή ανεπάρκεια. Ένα ακόμη σημαντικό μειονέκτημα είναι η αντίσταση που εμφανίζουν τα καρκινικά κύτταρα στη δοξορουβικίνη. Οι μηχανισμοί αντίστασης δεν είναι πλήρως κατανοητοί, αλλά συνήθως οφείλεται σε αλλαγές στην έκφραση και τη διαμόρφωση της τοποϊσομεράσης II, ή σε μη αποτελεσματική μεταφορά στο επιθυμητό σημείο. Έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικές προσεγγίσεις για να ξεπεραστούν οι παρενέργειες της δοξορουβικίνης, χρησιμοποιώντας συστήματα χορήγησης φαρμάκων, που περιλαμβάνουν νανοσωματίδια, λιποσώματα, πολυμερή, μικκύλια ή άλλου είδους συζεύγματα με το φάρμακο, με κατάλληλες τροποποιήσεις στις δύο δραστικές ομάδες της δοξορουβικίνης, την -OH και την -NH<sub>2</sub>. [70][71][72]

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Σύνθεση, χαρακτηρισμός και αξιολόγηση ενός νέου χρωμοφόρου πυρήνα, μέσω πολυσυστατικών αντιδράσεων με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας, με ενδεχόμενη εφαρμογή ως διαγνωστικό ή θεραπευτικό εργαλείο έναντι του καρκίνου





## Υλικά και μέθοδοι

Όλα τα εμπορικά διαθέσιμα χημικά χρησιμοποιήθηκαν όπως είναι, δίχως κάποιον επιπλέον καθαρισμό. Όλα τα ευαίσθητα, στον ατμοσφαιρικό αέρα ή την υγρασία, αντιδραστήρια σε υγρή μορφή μεταφέρθηκαν μέσω σύριγγας. Οι οργανικοί πτητικοί διαλύτες απομακρύνθηκαν από τα διαλύματα μέσω περιστροφικού εξατμιστήρα υπό κενό σε κατάλληλη θερμοκρασία. Οι μη πτητικοί διαλύτες απομακρύνθηκαν με λυοφιλοποίηση στα 0,1 mbar, 25°C για κατάλληλο χρονικό διάστημα. Για την απομόνωση ενώσεων, μέσω χρωματογραφίας στήλης, χρησιμοποιήθηκε πυριτική γέλη Acros Organics 60 (230-400 mesh). Για τον έλεγχο της πορείας των αντιδράσεων 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) στα 254 και 366 nm.

Για τη σύνθεση χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- Από την εταιρεία Alfa-Aesar: 1,3-ινδανδιόνη, 1-(2,4-διϋδροξυφαινυλ)αιθαν-1-όνη, Ιωδομεθάνιο, Μαλονονιτρίλιο, 5-αμινο-ινδόλιο 98%, 4-διμεθυλαμινοκινναλδεΐδη 98%, Δοξορουβική Υδροχλωρική 98%,
- Από την εταιρεία Fluorochem: 8-Υδροξυ-1,2,3,5,6,7-εξαϋδροπυριδο[3,2,1-ij]κινολινο-9-καρβαλδεΐδη, 4-υδροξυ-βενζαλδεΐδη 98%,
- Από την εταιρεία Sigma-Aldrich: 4-αμινο-φαινόλη 97%, Μεταλλικό νάτριο 98%, Πιπεριδίνη 98%, Αιθανόλη 95%, Τολουόλιο 98%, 4-διμεθυλαμινο-πυριδίνη 95%, Υδροχλωρικό οξύ, Μεθανόλη 99,9%, Οξικός ανυδρίτης
- Από την εταιρεία Senn Chemicals: N,N-δικυκλοεξυλκαρβοδιμίδιο 98%

### Φασματοσκοπία NMR

Τα φάσματα  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ελήφθησαν σε φασματόμετρο Bruker Avance FT-NMR 250MHz, 400 MHz ή 500 MHz. Το πρόγραμμα Topspin 2.1 χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των φασμάτων. Στα φάσματα  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ , οι τιμές της χημικής μετατόπισης δίνονται σε ppm. Στην ανάλυση των φασμάτων, η πολλαπλότητα παρίσταται ως εξής: s απλή κορυφή, d διπλή κορυφή, dd διπλή διπλής κορυφή, ddd διπλή διπλής διπλή κορυφή, t τριπλή και m πολλαπλή κορυφή.

### Φασματοσκοπία UV-Vis

Τα φάσματα UV-Vis καταγράφηκαν με φασματοφωτόμετρο Edinburg D5S σε κυψελίδα χαλαζία 1 cm σε διάφορες θερμοκρασίες, ανάλογα το πείραμα. Για την λήψη των φασμάτων απορρόφησης χρησιμοποιήθηκε τυφλό δείγμα, που περιείχε τον εκάστοτε διαλύτη του πειράματος και έγινε μέτρηση της έντασης απορρόφησης συναρτήσει του μήκους κύματος από τα 250-900 nm.

### Φασματοσκοπία φθορισμού

Τα φάσματα φθορισμού καταγράφηκαν με φθορισμόμετρο Edinburg F5S σε κυψελίδα χαλαζία 1 cm, 3 ml, σε διάφορες θερμοκρασίες. Αρχικά έγινε λήψη ενός φάσματος εκπομπής με διέγερση στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης, που προέκυψε από τη φασματοσκοπία UV-Vis. Από το φάσμα εκπομπής προέκυψε ένα μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την λήψη του φάσματος διέγερσης. Τέλος, από το μέγιστο μήκος κύματος διέγερσης λήφθηκε το τελικό, διορθωμένο φάσμα φθορισμού.

### Παρασκευαστικοί καθαρισμοί με RP-HPLC

Οι παρασκευαστικοί καθαρισμοί RP-HPLC πραγματοποιήθηκαν σε χρωματογράφο ThermoScientific Ultimate 3000 εξοπλισμένο με αντλία Dionex Ultimate 3000 και ανιχνευτή μήκους κύματος. Οι παρασκευαστικοί καθαρισμοί πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας μια στήλη Phenomenex Jupiter 10 μm Proteo 90Å C18 (250 × 21.2 mm) με ροή 20 mL min<sup>-1</sup>. Ο ανιχνευτής μήκους κύματος ήταν ρυθμισμένος στα 254 nm σε όλους τους καθαρισμούς.

### Φασματομετρία Μάζης

Τα φάσματα μάζης λήφθηκαν σε φασματόμετρο μάζας Xevo G2 Q-TOF, όπου χρησιμοποιήθηκε σε λειτουργία θετικού ESI (Ιονισμός Ηλεκτροψεκασμού, ElectroSpray Ionization) για άμεση λήψη έγχυσης με χρήση πλήρους σάρωσης MS σε εύρος σάρωσης μάζας 50–1200 m/z. Τυπικές συνθήκες πηγής για τη μέγιστη ένταση των ιόντων ήταν οι εξής: τριχοειδής τάση 3,0 kV, δείγμα κώνου 40 V, θερμοκρασία πηγής 120 °C, θερμοκρασία αποδιάλυσης 550 °C, ταχύτητα ροής αερίου κώνου 100 L h<sup>-1</sup>, ταχύτητα ροής αερίου αποδιάλυσης (N<sub>2</sub>) 600 L h<sup>-1</sup>.

### Σύνθεση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

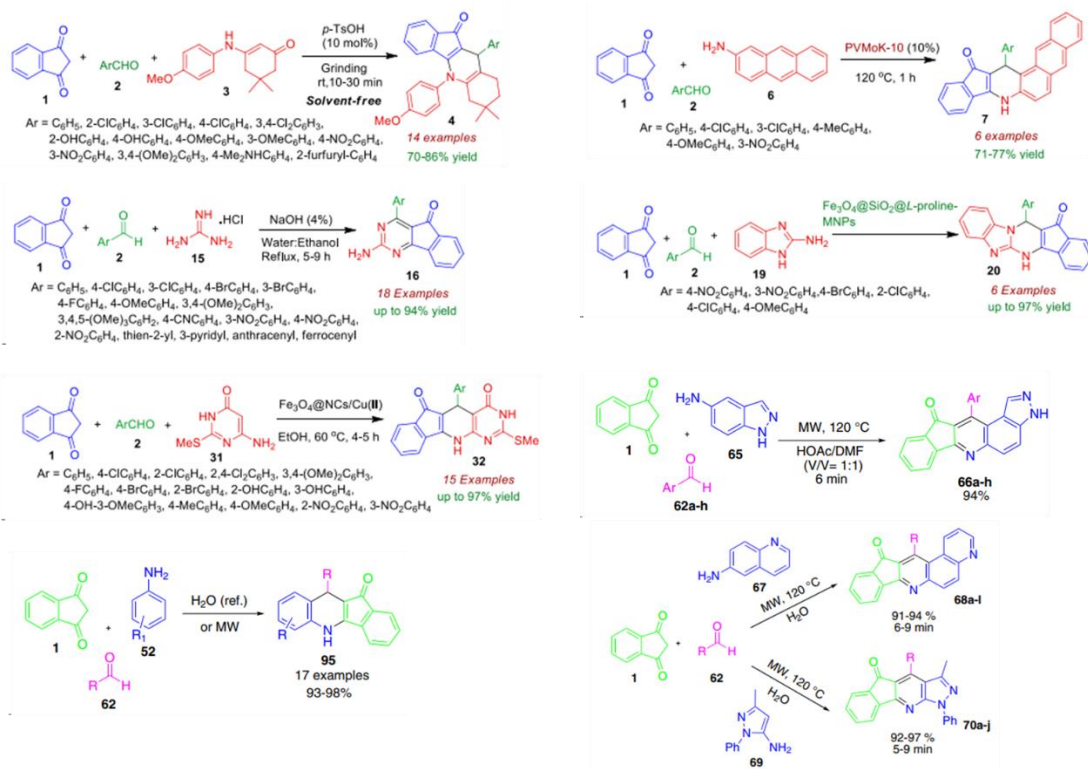
Για τη σύνθεση με μικροκύματα χρησιμοποιήθηκε ένα όργανο CEM 908005 Discover system Microwave synthesizer 300 W.

## **2.1 Σχεδιασμός, σύνθεση και αξιολόγηση φθοριζουσών ενώσεων, μέσω αντιδράσεων πολλαπλών σταδίων και αντιδραστηρίων σε ένα βήμα, με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας, με σκοπό να ανταποκρίνονται στο μικροπεριβάλλον του καρκίνου**

### **2.1.1 Ορθολογικός σχεδιασμός**

Στην παρούσα διατριβή έγινε προσπάθεια σύνθεσης και αξιολόγησης ενός νέου πολυλειτουργικού φθοροφόρου υποστρώματος, μέσω πολλαπλών αντιδράσεων, οι οποίες συμβαίνουν σε ένα βήμα. Συγκεκριμένα ως βασικός κορμός χρησιμοποιήθηκε ένα κοινό στη διεθνή βιβλιογραφία οργανικό μόριο, η 1,3-ινδανδιόνη, λόγω των ιδιοτήτων της, όπως το χαμηλό κόστος, η εύκολη χρήση, η φιλικότητα προς το περιβάλλον και οι υψηλές αποδόσεις των αντιδράσεων, στις οποίες συμμετέχει ως αντιδρών. [73] Επιπλέον, η 1,3-ινδανδιόνη, ως μία β-δικετόνη, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση ετεροκυκλικών ενώσεων με πιθανές φαρμακευτικές δράσεις. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν οι ινδανοπυριδίνες, οι οποίες συναντώνται και σε πολλά φυσικά προϊόντα και έχει αποδειχθεί πως έχουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες, όπως αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές. Για παράδειγμα, αρκετά ανάλογα ινδανοπυριδίνης έχουν μελετηθεί ως αναστολείς της τοποϊσομεράσης II, ένα ένζυμο αρκετά σημαντικό στις διαδικασίες ανάπτυξης και διαίρεσης των κυττάρων. [74][75][76] Επίσης, υπάρχει έρευνα που αναφέρει ότι κάποιες ινδανοπυριδίνες δρουν ως αναστολείς ενζύμων, που υπερεκφράζονται στον καρκίνο, όπως η καρβονική ανυδράση. [77]

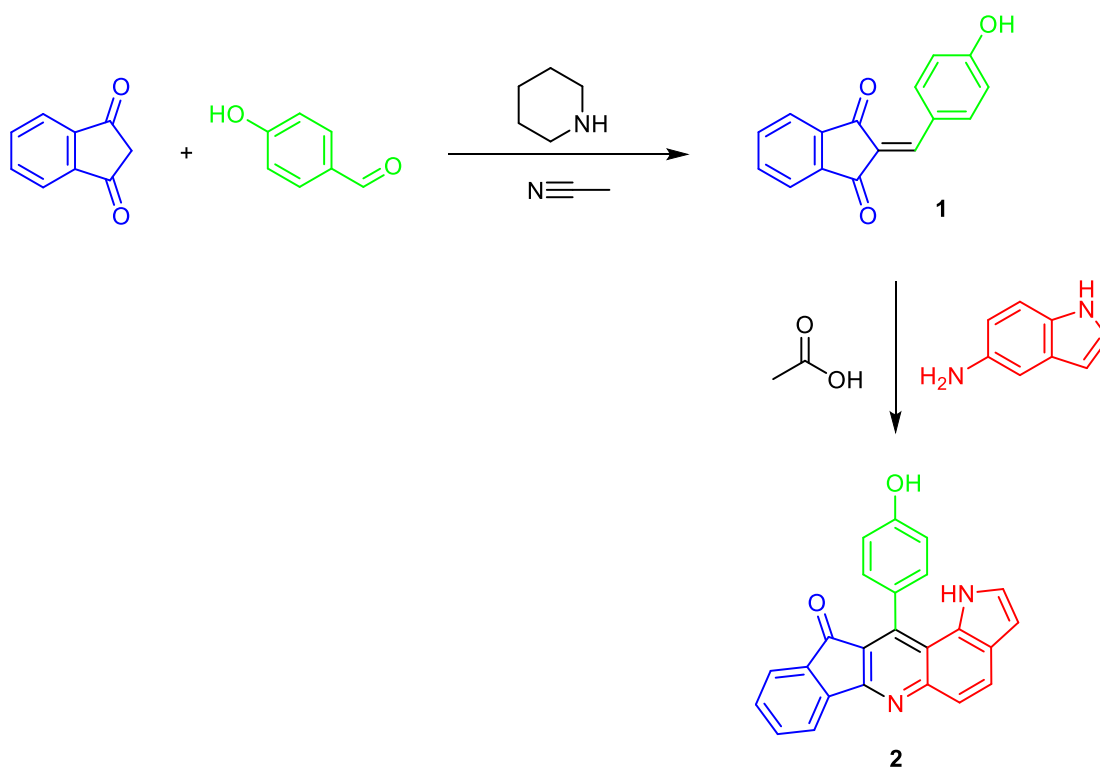
Όπως παρουσιάζεται και στην **Εικόνα 18**, υπάρχουν αρκετές συνθετικές πορείες που έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά για τη σύνθεση τέτοιων πολυλειτουργικών ενώσεων. [78][79]



**Εικόνα 18.** Προσεγγίσεις για τη σύνθεση ινδενοπυριδινών. [80]

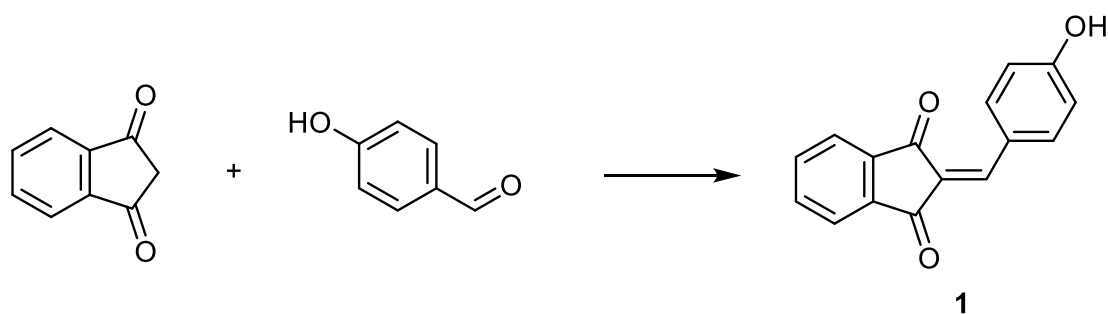
Λαμβάνοντας αυτό υπόψη και κρατώντας ως σταθερό άξονα την ινδανδιόνη, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες άλλες δραστικές ενώσεις, όπως αλδεΐδες και αρωματικές αμίνες. Τελικός σκοπός ήταν να συντεθούν χρωμοφόρα μόρια, τα οποία διαθέτουν ομάδες δότες και δέκτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας, οι οποίες επικοινωνούν μέσω του ICT φαινομένου και έτσι εμφανίζουν φθορισμό στην περιοχή NIR I, αλλά συγχρόνως διαθέτουν και δραστικές ομάδες, οι οποίες με κατάλληλες χημικές τροποποιήσεις μπορούν να ανταποκρίνονται στο καρκινικό μικροπεριβάλλον, καθιστώντας τα μόρια αυτά διαγνωστικά εργαλεία. Επιπλέον, αυτά τα μόρια ενδέχεται να χρησιμοποιηθούν μετέπειτα για να στοχεύσουν διάφορα ένζυμα που εμπλέκονται στην καρκινογένεση, εμφανίζοντας ταυτόχρονα θεραπευτική δράση, εκτός της διαγνωστικής.

### 2.1.2 Σύνθεση της φθορίζουσας ένωσης 2



**Εικόνα 19.** Πειραματική πορεία της σύνθεσης της χρωστικής ένωσης 2. Αντιδραστήρια και Διαλύτες: (α) Ακετονιτρίλιο, Πιπεριδίνη, 82 °C, 6 ώρες, (β) 5-αμινο-ινδόλιο, άνυδρο οξικό οξύ, 118 °C, 15 ώρες.

#### Σύνθεση της ένωσης 1



**Εικόνα 20.** Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 1

#### Πειραματική πορεία

Σε μία σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκαν η 1,3-ινδανδιόνη (100 mg, 0,684 mmol) και η 4-υδρόξυ-βενζαλδεΰδη (83,5 mg, 0,684 mmol). Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το ακετονιτρίλιο. Ακολούθησε προσθήκη καταλυτικής ποσότητας πιπεριδίνης, η οποία λειτουργεί ως βάση. Το αντιδρών μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση με θέρμανση, υπό αναρροή (82 °C) για 6 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε διαλύτη ανάπτυξης διχλωρομεθάνιο, μέχρι σχεδόν πλήρους κατανάλωσης των αντιδρώντων. Έπειτα, ακολούθησε εξάτμιση του διαλύτη σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό χαμηλή πίεση. Η

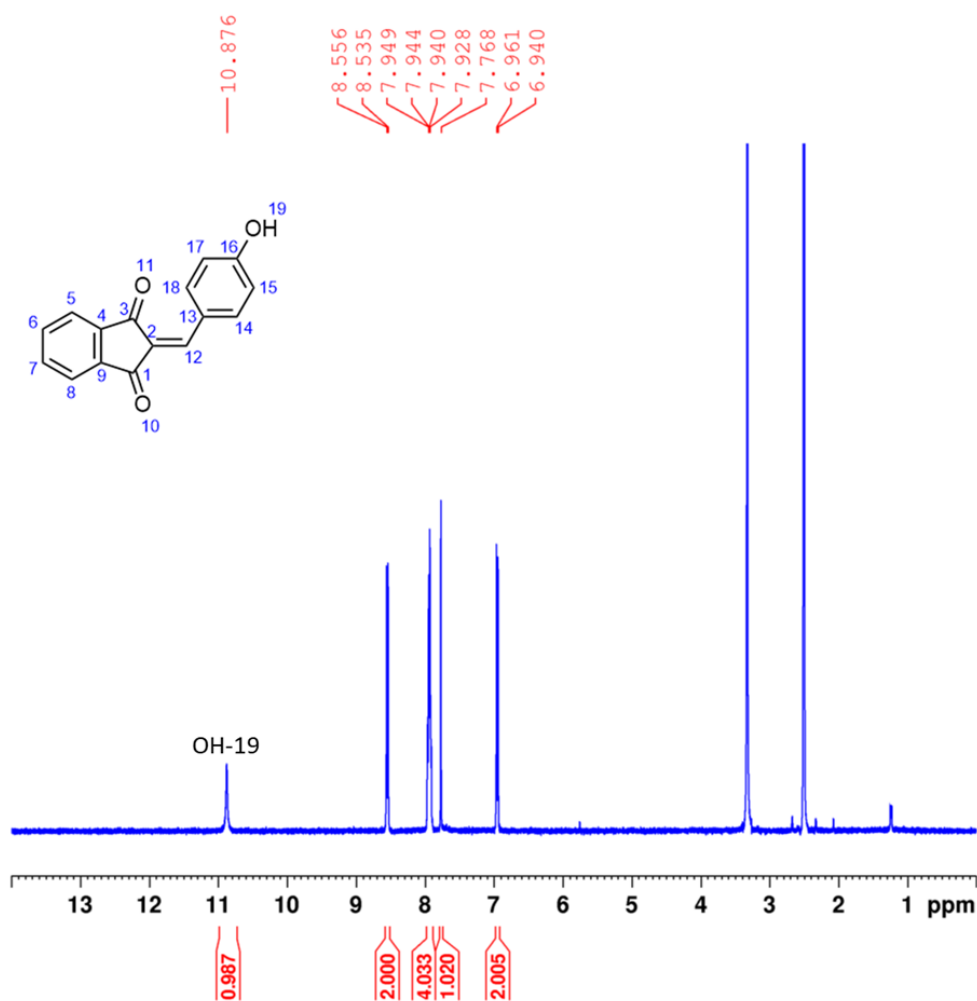
απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (Silica gel) σε σύστημα διαλυτών έκλουσης μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο (έκλυση επιθυμητού προϊόντος σε 1% v/v μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο). Η απόδοση της αντίδρασης έπειτα από την απομόνωση του επιθυμητού κίτρινου στερεού προϊόντος ήταν της τάξης του 94% (160 mg).

#### Πιθανός μηχανισμός της εν λόγω αντίδρασης

Η συγκεκριμένη αντίδραση προχωρά μέσω μιας αντίδρασης συμπύκνωσης Knoevenagel, καταλυόμενης από βάση, μεταξύ της β-δικετόνης και της αλδεΐδης, για να προκύψει μια α,β-ακόρεστη καρβονυλική ένωση.

#### Ταυτοποίηση της ένωσης 1

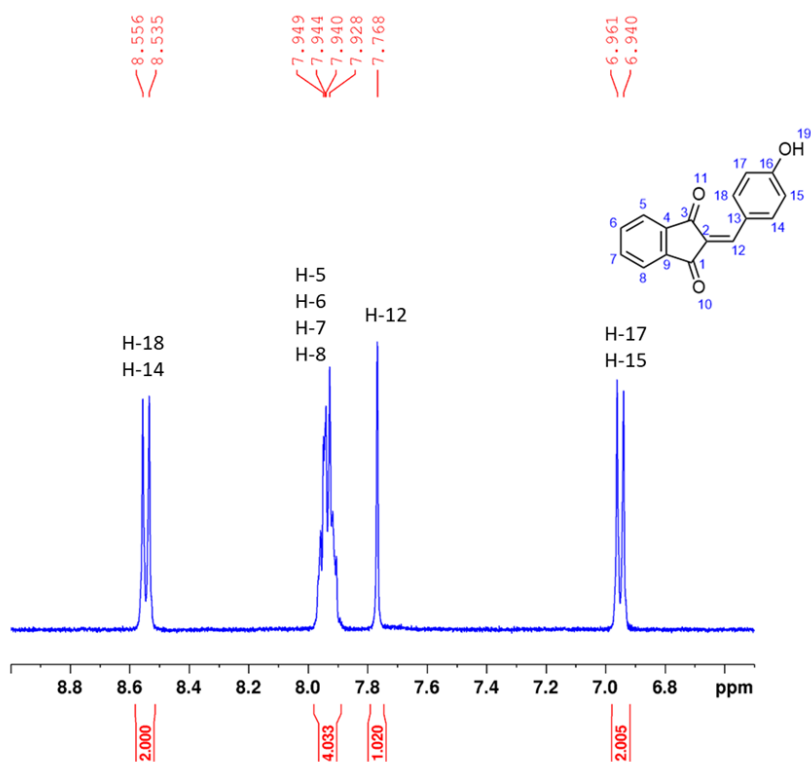
Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός της ένωσης 1 με φασματοσκοπία NMR  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ .



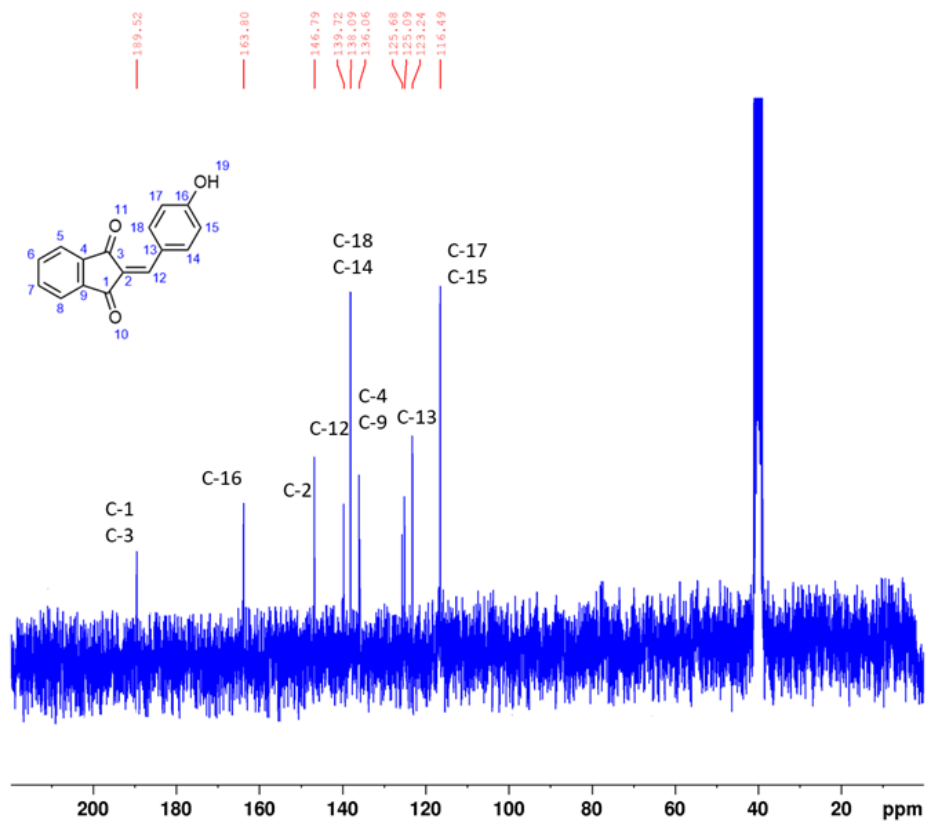
**Εικόνα 21.** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 1 σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}^6$  (400 MHz, 25 °C).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO):  $\delta$  10.88 (s, 1H, OH-19), 8.55 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, H-18, H-14), 7.93 (dq,  $J$  = 11.0, 4.3 Hz, 4H, H-5, H-6, H-7, H-8), 7.77 (s, 1H, H-12), 6.95 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H, H-15, H-17).

Ακολουθεί και μεγέθυνση του φάσματος στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων.



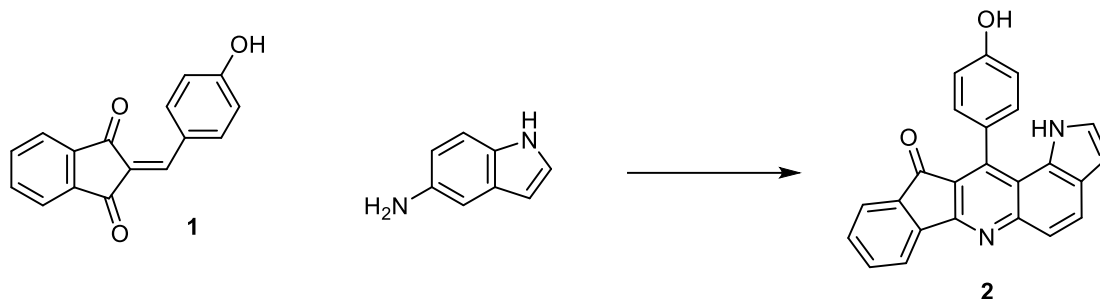
Εικόνα 22. Φάσμα  $^1\text{H NMR}$  της ένωσης 1 σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}^6$  (400 MHz, 25 °C).



Εικόνα 23. Φάσμα  $^{13}\text{C NMR}$  της ένωσης 1 σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}^6$  (63 MHz, 25 °C).

$^{13}\text{C}$  NMR (63 MHz, DMSO):  $\delta$  189.52 (C-1,C-3), 163.80 (C-16), 146.79 (C-2), 139.72 (C-12), 138.09 (C-14,C-18), 136.06 (C-4,C-9), 125.68 και 125.09 (C-5, C-8 και C-6,C-7), 123.25 (C-13), 116.50 (C-16).

#### Σύνθεση της ένωσης 2



**Εικόνα 24.** Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 2.

#### Πειραματική πορεία

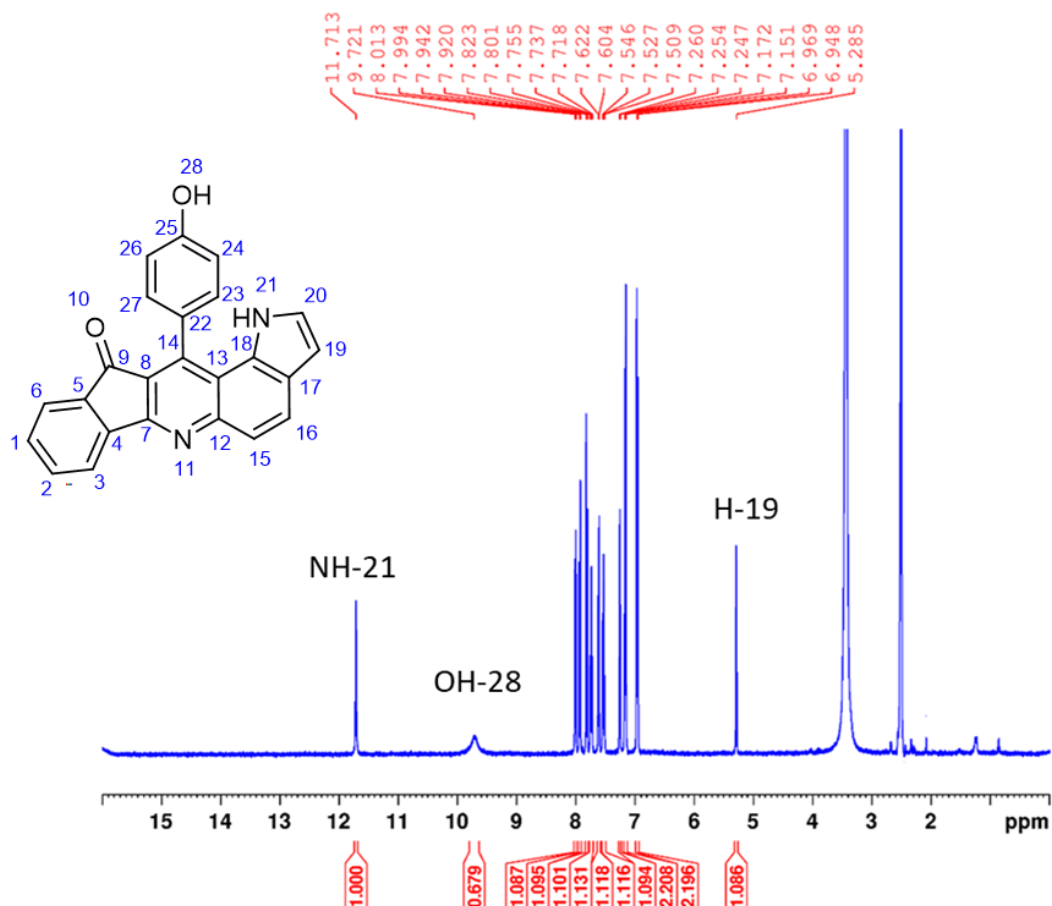
Σε ένα διάλυμα της ένωσης 1 (150 mg, 0,6 mmol) σε άνυδρο οξικό οξύ, σε σφαιρική φιάλη, προστέθηκε το 5-αμινο ινδόλιο (80 mg, 0,6 mmol). Το αντιδρών μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση με θέρμανση, υπό αναρροή (118 °C) για 15 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε διαλύτη ανάπτυξης διχλωρομεθάνιο, μέχρι σχεδόν πλήρους κατανάλωσης των αντιδρώντων. Έπειτα, ακολούθησε εξάτμιση του διαλύτη υπό χαμηλή πίεση. Η απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (Silica gel) σε σύστημα διαλυτών έκλουσης μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο (έκλυση επιθυμητού προϊόντος σε 0,5% v/v μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο). Η απόδοση της αντίδρασης έπειτα από την απομόνωση του επιθυμητού καφέ στερεού προϊόντος ήταν της τάξης του 20% (43 mg).

#### Πιθανός μηχανισμός της εν λόγω αντίδρασης

Η εν λόγω συνθετική πορεία της ένωσης 2 λαμβάνει χώρα αρχικά μέσω μιας προσθήκης aza-Michael στον β-άνθρακα του α,β-ακόρεστου καρβονυλικού συστήματος της ένωσης 1. Έπειτα, ακολουθεί μια αντίδραση ενδομοριακής αλδολικής συμπύκνωσης, ώστε να προκύψει ο δακτύλιος της ινδενο-πυριδίνης.

#### Ταυτοποίηση της ένωσης 2

Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός της ένωσης 2 με φασματοσκοπία NMR  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ , καθώς επίσης και με φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων και φασματομετρία μάζης.

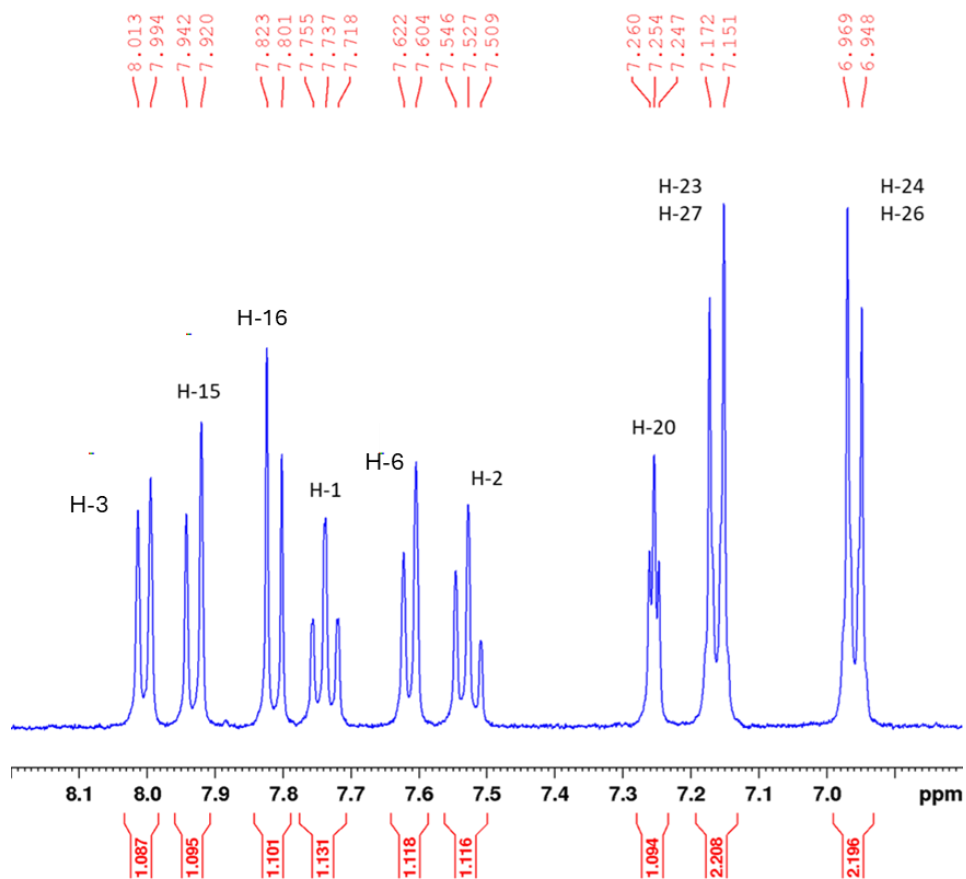


Εικόνα 25. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της ένωσης 2 σε διαλύτη DMSO-d<sup>6</sup> (400 MHz, 25 °C).

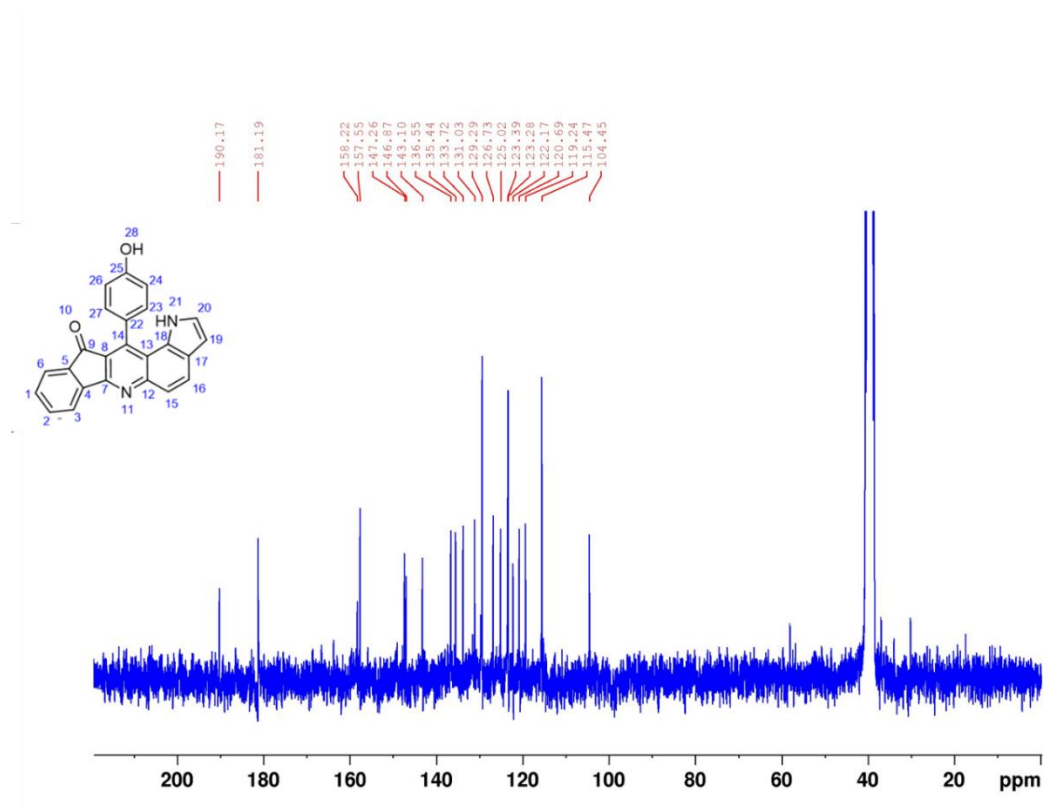
Ακολουθεί εικόνα μεγέθυνσης του φάσματος <sup>1</sup>H για να είναι πιο ευκρινής η περιοχή των αρωματικών πρωτονίων.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO):** δ 11.71 (s, 1H, NH-21), 9.70 (s, 1H, OH-28), 8.00 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-3), 7.93 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-15), 7.81 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-16), 7.74 (td, *J* = 7.4, 1.2 Hz, 1H, H-1), 7.61 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-6), 7.53 (dd, *J* = 7.4, 7.3 Hz, 1H, H-2), 7.25 (t, *J* = 2.8 Hz, 1H, H-20), 7.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-23 και H-27), 6.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-24 και H-26), 5.28 (s, 1H, H-19).





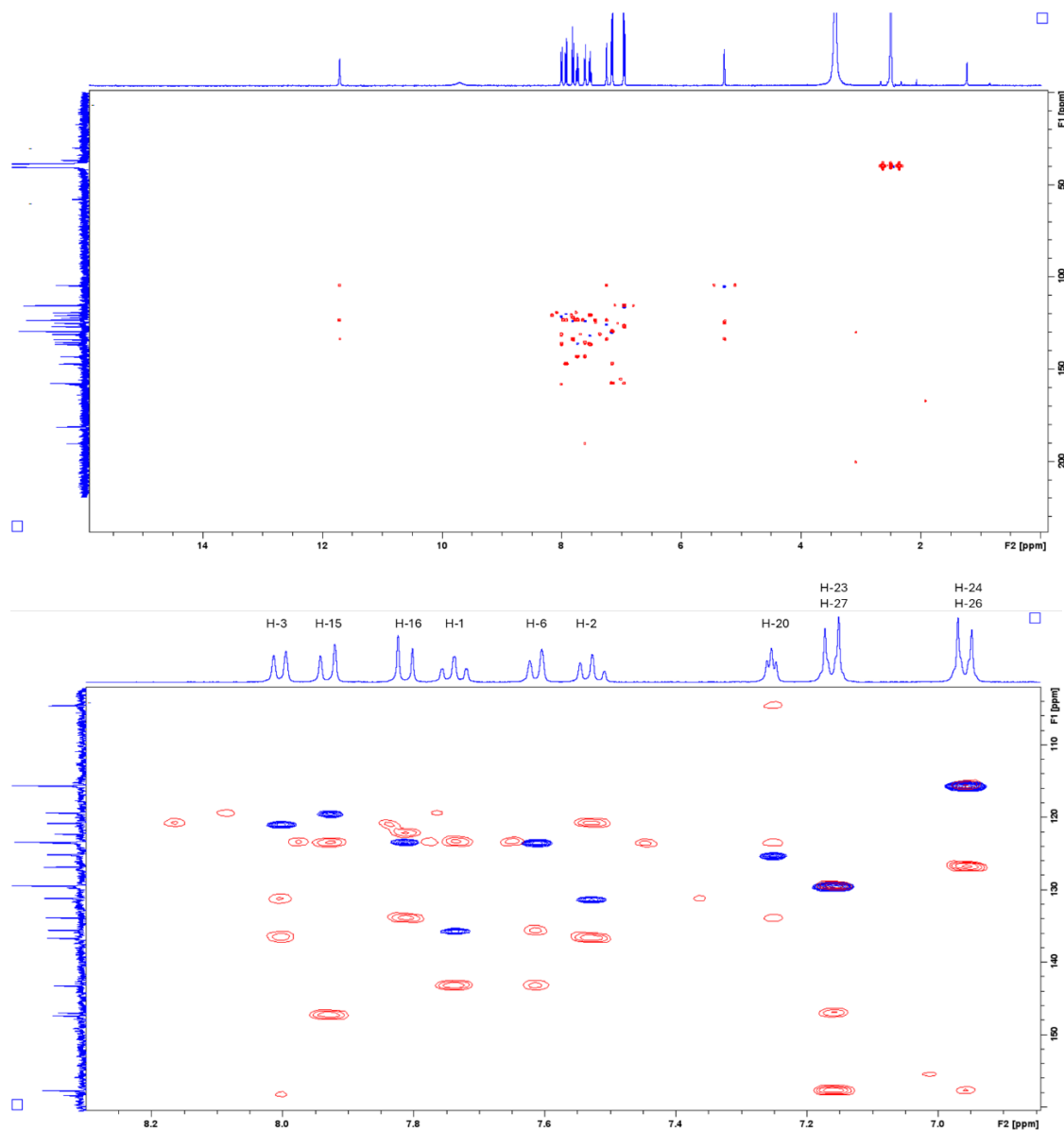
Εικόνα 26. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 2 σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}^6$  με μεγέθυνση στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων (400 MHz, 25 °C).



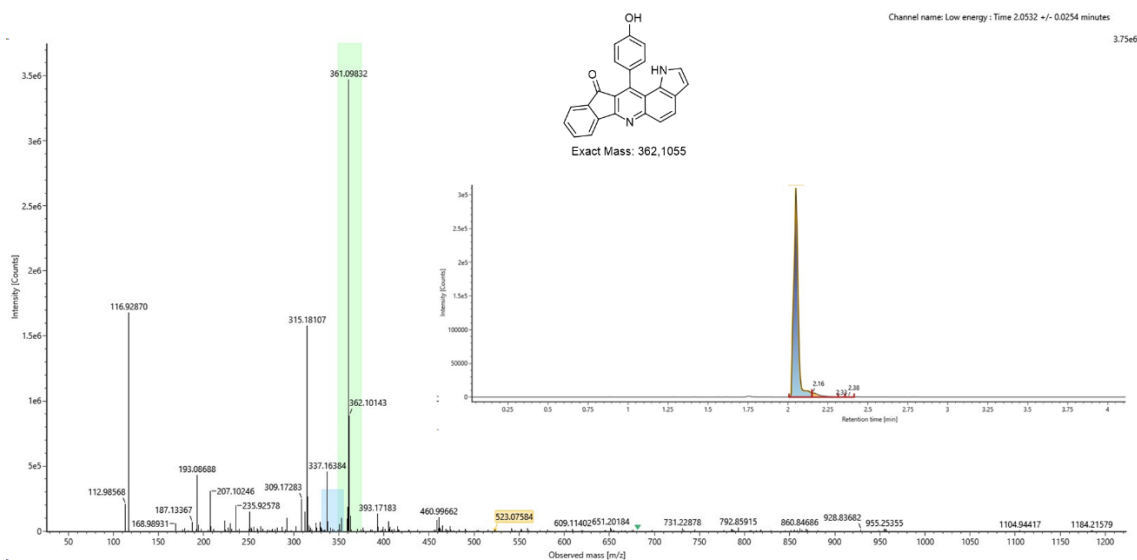
Εικόνα 27. Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 2 σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}^6$  (101 MHz, 25 °C).

**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO):**  $\delta$  190.17 (C-9), 181.19 (C-25), 158.22 (C-7), 157.55 (C-14), 147.26 (C-12), 146.86 (C-8), 143.11 (C-5), 136.55 (C-4), 135.44 (C-1), 133.72 (C-17), 131.03 (C-2), 129.30 (C-23 και C-27), 126.73 (C-22), 125.02 (C-20), 123.39 (C-6), 123.28 (C-16 και C-13 [όχι ισοδύναμοι]), 122.17 (C-18), 120.69 (C-3), 119.24 (C-15), 115.47 (C-24 και C-26), 104.43 (C-19).

Ακολουθεί φάσμα δύο διαστάσεων (HSQC και HMBC), όπως επίσης και φάσμα μάζας, για την καλύτερη ταυτοποίηση της ένωσης 2.



**Εικόνα 28.** Υπέρθυση φασμάτων  $2\text{D } ^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  HSQC (μπλε)-HMBC (κόκκινο) της ένωσης 2 σε  $\text{DMSO-}d^6$  (500 MHz, 25 °C).



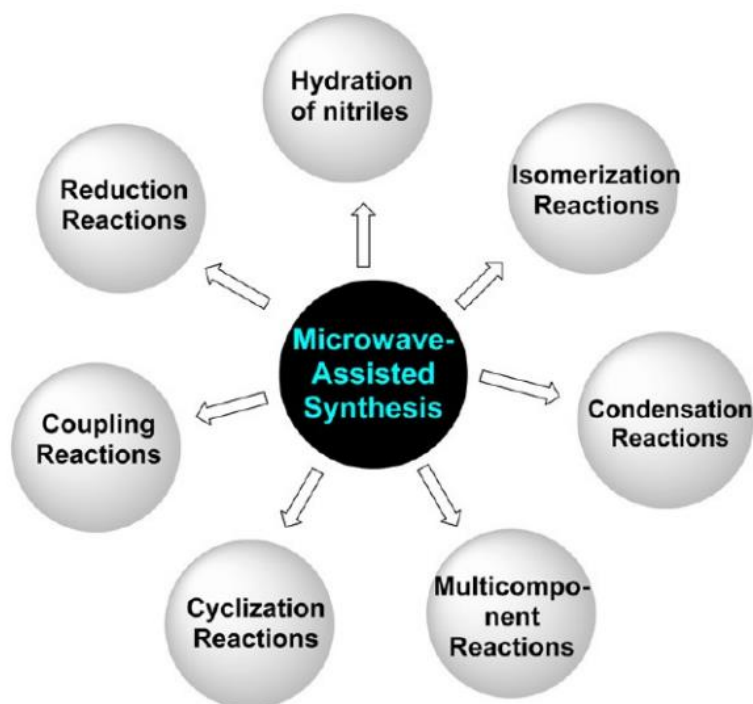
**Εικόνα 29.** Χρωματογράφημα και φάσμα μάζας υψηλής ανάλυσης της ένωσης 2. Η μάζα της ένωσης είναι ίση με 362.1055. Η κορυφή στο  $m/z$  ίσο με 361.0983 αντιστοιχεί στο [M-H].

Εφόσον η εν λόγω σύνθεση ήταν επιτυχής, έγινε προσπάθεια να συντεθεί η ένωση 2 με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας σε ένα στάδιο, με ανάμιξη της 1,3-ινδανδιόνης, της 4-υδροξυ βενζαλδεΐδης και του 5-άμινο ινδολίου σε κατάλληλο σύστημα διαλυτών και κατάλληλη θερμοκρασία, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολούθησε και η ερευνητική ομάδα του Feng Shi και των συνεργατών του (2010). [81] Η μέθοδος αυτή επιλέχθηκε, καθώς σύμφωνα με την βιβλιογραφία είναι αρκετά γρήγορη και υψηλής απόδοσης σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους.

Η τεχνική της θέρμανσης με μικροκύματα εδώ και σχεδόν τρεις δεκαετίες έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον σε αρκετούς κλάδους της Χημείας, όπως για παράδειγμα στη χημεία στερεής φάσης, στη σύνθεση νανοϋλικών και στην οργανική σύνθεση, όταν αυτό είναι συμβατό. Η οργανική σύνθεση υποβοηθούμενη από μικροκύματα εκμεταλλεύεται τη διηλεκτρική θέρμανση ως εναλλακτική πηγή θερμότητας. Αυτό το φαινόμενο βασίζεται στην αύξηση της θερμοκρασίας, η οποία συμβαίνει, είτε με διπολική πόλωση, είτε με ιοντική αγωγιμότητα. Ειδικότερα, η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία διοχετεύεται ως θερμότητα, όταν τα δίπολα ή τα ιόντα, που υπάρχουν στο μείγμα αντίδρασης ευθυγραμμίζονται στο εφαρμοσμένο ηλεκτρικό πεδίο. [82],[83],[84] Κάποια από τα βασικά πλεονεκτήματα της οργανικής σύνθεσης υποβοηθούμενης από μικροκύματα περιλαμβάνουν:

A) Την επιτάχυνση των αντιδράσεων, B) Την στοχευμένη και εις βάθος θέρμανση του μείγματος της αντίδρασης, Γ) Την αύξηση της απόδοσης, λόγω βελτιστοποίησης των συνθηκών και ελαχιστοποίησης των παράπλευρων αντιδράσεων, Δ) Βελτιωμένη εκλεκτικότητα, E) Χαμηλότερη κατανάλωση ενέργειας, επειδή η ενέργεια εφαρμόζεται απευθείας στο μείγμα της αντίδρασης, μειώνοντας την απώλεια θερμότητας στο περιβάλλον, ΣΤ) Εξοικονόμηση οργανικών διαλυτών και καταλυτών-Λιγότερα απόβλητα-Πράσινη Χημεία.

Εξαιτίας αυτών των πλεονεκτημάτων η χρήση μικροκυμάτων έχει χρησιμοποιηθεί σε μια πληθώρα οργανικών αντιδράσεων, όπως παρουσιάζεται και στην **Εικόνα 30**.



**Εικόνα 30.** Εφαρμογές της οργανικής σύνθεσης με χρήση μικροκυμάτων. [84]

Στο πλαίσιο αυτό, παρατηρούμε επίσης πως η ακτινοβολήση με μικροκύματα είναι ιδιαίτερα ευεργετική στη σύνθεση N-ετεροκυκλικών ενώσεων με σημαντική φαρμακευτική δράση, καθώς επίσης και σε αντιδράσεις πολλών αντιδρώντων (Multicomponent Reactions). [82]

Λαμβάνοντας υπόψη όλα αυτά προχωρήσαμε στη σύνθεση της ένωσης 2 με την πορεία που προαναφέρθηκε, χρησιμοποιώντας διάφορα συστήματα διαλυτών και διάφορες τιμές θερμοκρασίας.

#### Πειραματική πορεία

Η 1,3-ινδανδιόνη (50 mg, 0,3421 mmol), η 4-υδροξυβενζαλδεΐδη (41,8 mg, 0,3421 mmol) και το 5-αμινο ινδόλιο (45,2 mg, 0,3421 mmol) τοποθετήθηκαν σε κατάλληλο αυτόκλειστο δοχείο και έγινε προσθήκη των διαλυτών. Ακολουθήθηκε ακτινοβολήση του μείγματος με ισχύ 200 Watt σε διάφορες θερμοκρασίες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών 5% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μέχρι και 120 λεπτά από την έναρξη της αντίδρασης. Η απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (Silica gel) σε σύστημα διαλυτών έκλουσης 0,5 % v/v μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν, οι τιμές θερμοκρασίας και οι αποδόσεις της αντίδρασης συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

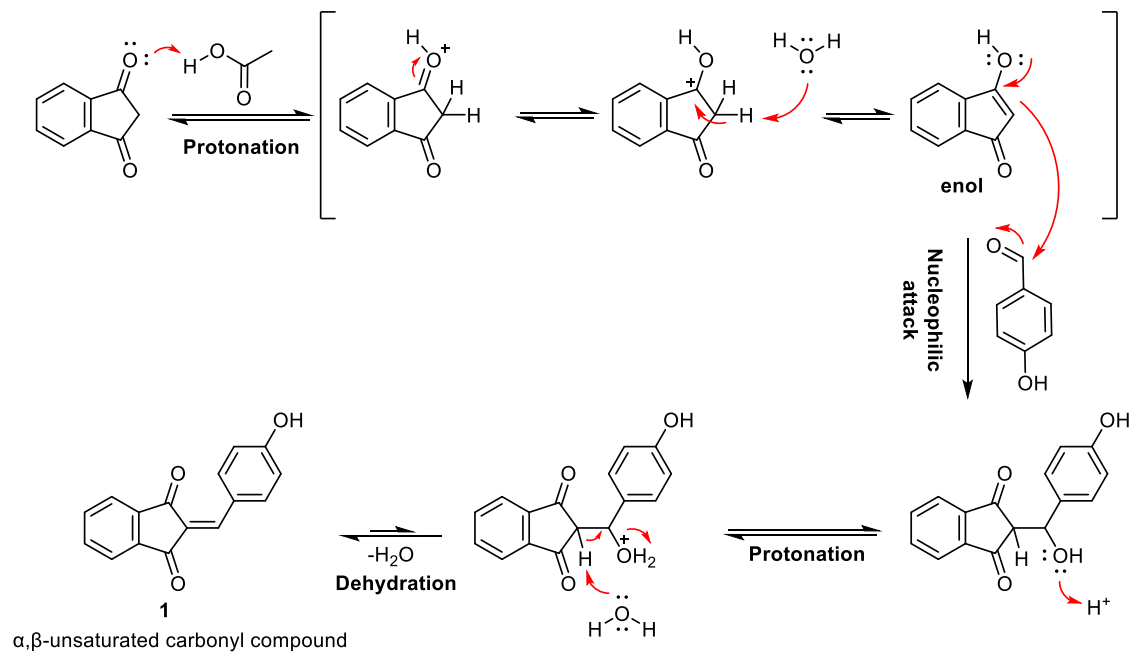
Διαλύτης/Οξύ	Θερμοκρασία	Χρόνος (min)	Απόδοση-Ποσότητα προϊόντος
Ακετονιτρίλιο/Οξικό οξύ (1:1 v/v)	82 °C	10	4% (4,96 mg)
Ακετονιτρίλιο/Οξικό οξύ (1:1 v/v)	100 °C	10	4,5% (5,58 mg)

N,N- Διμεθυλοφορμαμίδιο/Οξικό οξύ (1:2 v/v)	120 °C	10	8,1% (10 mg)
N,N- Διμεθυλοφορμαμίδιο/Οξικό οξύ (1:2 v/v)	120 °C	30	11,4% (14,11 mg)
N,N- Διμεθυλοφορμαμίδιο/Οξικό οξύ (1:2 v/v)	120 °C	120	39% (48,3 mg)
Νερό/πάρα-τολουόλο σουλφονικό οξύ (0,5 eq)	100 °C	10	3,8% (4,7 mg)
Νερό/πάρα-τολουόλο σουλφονικό οξύ (0,5 eq)	100 °C	120	14,6% (18,1 mg)

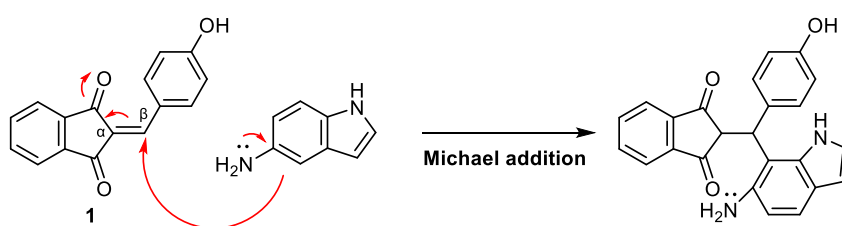
*Πίνακας 1. Σύνοψη των αποδόσεων και των διαφορετικών συνθηκών αντίδρασης, που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση της ένωσης 2 με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας.*

Προτεινόμενος μηχανισμός της εν λόγω αντίδρασης:

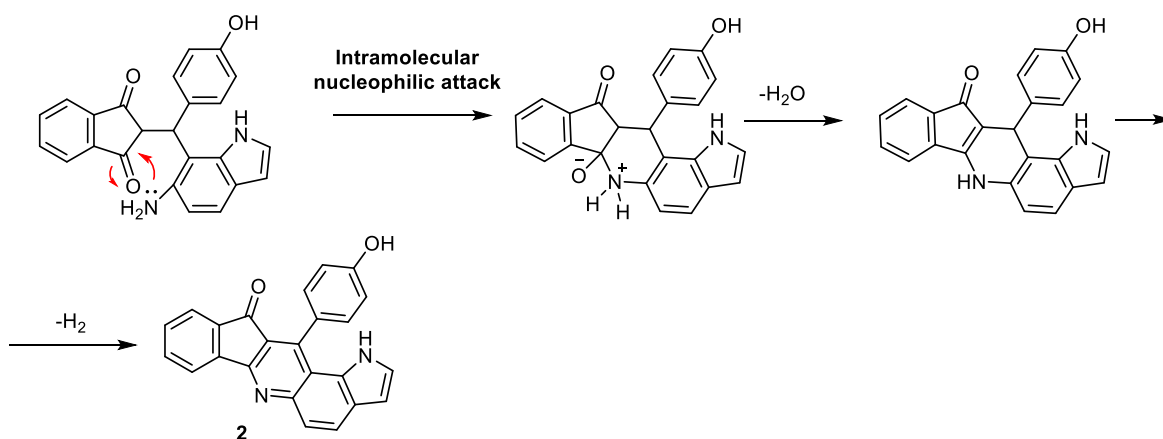
### Step 1: Acid catalyzed aldol reaction and dehydration



### Step 2: Aza-Michael reaction



### Step 3: Nucleophilic attack and dehydration



**Εικόνα 31.** Αναπαράσταση του προτεινόμενου μηχανισμού σύνθεσης της ένωσης 2.

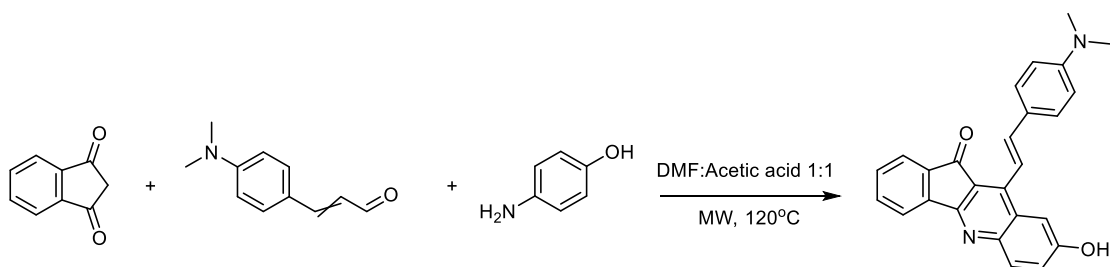
#### Παρατηρήσεις:

Καταρχάς, παρατηρήθηκε πως η ένωση 2 συντέθηκε επιτυχώς με αυτό το συνθετικό πρωτόκολλο. Βλέπουμε πως οι βέλτιστες συνθήκες για τη σύνθεση της ένωσης 2 είναι η χρήση του συστήματος N,N-Διμεθυλοφορμαμίδιο/Οξικό οξύ (1:2 v/v) σε θερμοκρασία 120 °C για χρόνο 120 λεπτών. Μολονότι οι βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης έρχονται σε

συμφωνία και με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, οι αποδόσεις δεν είναι οι προβλεπόμενες. Χαρακτηριστικά σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οι αντιδράσεις τέτοιου τύπου έχουν αποδόσεις της τάξης του 90% με τους χρόνους της αντίδρασης να είναι κάτω από 10 λεπτά. Πειραματικά αυτό δεν επιβεβαιώθηκε στην περίπτωση της ένωσης 2 ακόμα και σε χρόνους αντίδρασης άνω των δύο ωρών. Αυτό που παρατηρήθηκε επίσης είναι πως το κύριο προϊόν είναι η ένωση 1 για αυτούς τους χρόνους αντίδρασης, γεγονός που υποδηλώνει πως η αντίδραση έχει κυρίως σταματήσει στο στάδιο της συμπύκνωσης μεταξύ της 1,3-ινδανδιόνης και της 4-υδροξυβενζαλδεΐδης. Πιθανή εξήγηση, για τον λόγο που συμβαίνει αυτό μπορεί να είναι η κινητική της αντίδρασης ή ακόμα και το συγκεκριμένο υπόστρωμα ανιλίνης, που χρησιμοποιήθηκε.

Για αυτόν ακριβώς τον λόγο θελήσαμε να εξερευνήσουμε την εν λόγω αντίδραση και με άλλες αρωματικές αμίνες και αλδεΐδες. Ένα δεύτερο ανάλογο προέκυψε από την αντικατάσταση της 4-υδροξυβενζαλδεΐδης με την 4-διμεθυλαμινοκινναμαλδεΐδη και του 5-αμινοινδολίου από την 4-αμινοφαινόλη.

### Σύνθεση της ένωσης 3

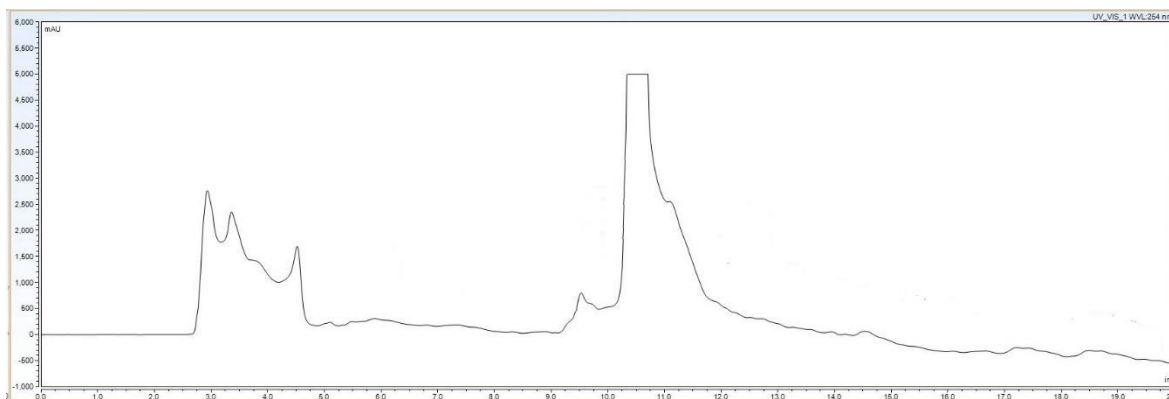


**Εικόνα 32.** Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 3.

### Πειραματική πορεία

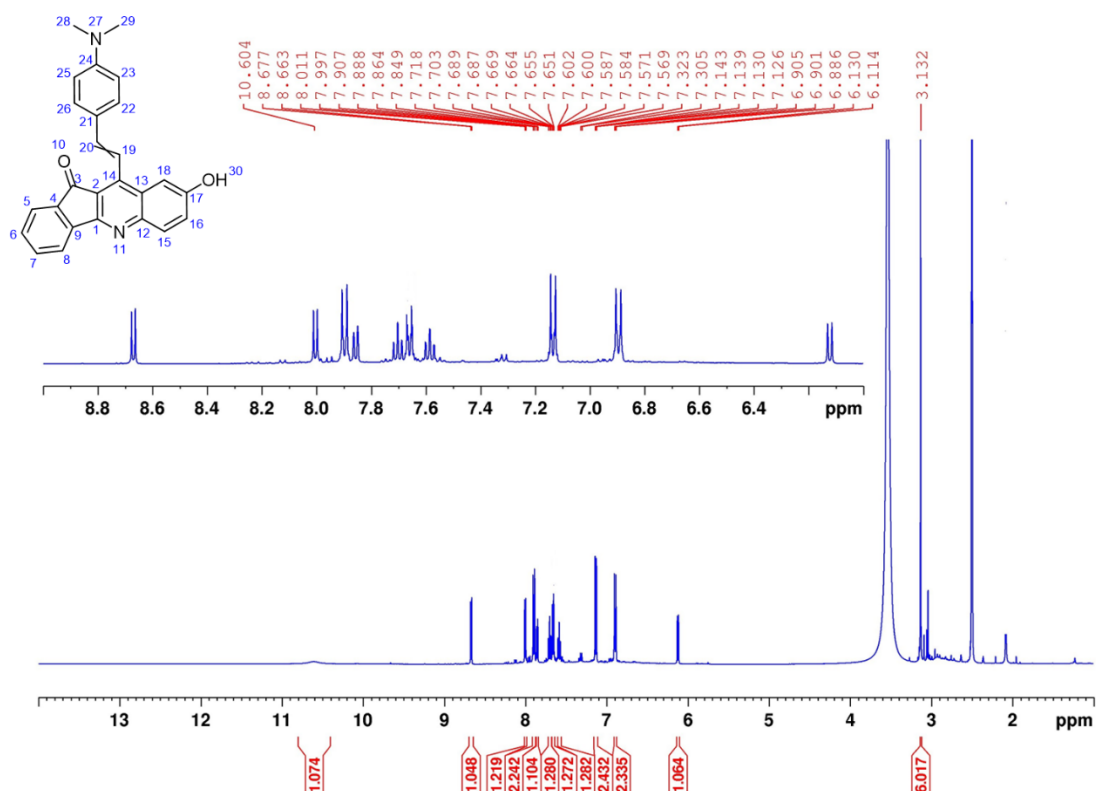
Η πορεία που ακολουθήθηκε για την σύνθεση της εν λόγω ένωσης περιλάμβανε την ανάμιξη των τριών αντιδρώντων (σε διάλυμα N,N-Διμεθυλοφορμαμίδιου: Οξικού οξέος σε αναλογία 1:1 v/v υπό άνυδρες συνθήκες και ροή N<sub>2</sub>), και την ακτινοβολήση με μικροκυματική ακτινοβολία ισχύος 200 Watt, σε θερμοκρασία 120°C για χρόνο 30 λεπτών. Η πορεία της αντίδρασης παρακολούθηθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών ανάπτυξης 5% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο. Παρατηρήθηκε πως τα αρχικά αντιδρώντα καταναλώθηκαν πλήρως εκτός της 4-αμινοφαινόλης, η οποία καταναλώθηκε μερικώς. Η απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης HPLC σε σύστημα διαλυτών έκλουσης ακετονιτρίλιο-νερό (20% ακετονιτρίλιο-80% νερό για t=0 min έως 80% ακετονιτρίλιο-20% νερό για t=20 min, με ροή διαλύτη 20 ml/min, ανιχνευτής στα 254 nm). Η έκλουση και συλλογή του επιθυμητού προϊόντος πραγματοποιήθηκε στα 10,5 min. Το διάλυμα λυοφιλοποιήθηκε προς απομάκρυνση του νερού και έτσι έγινε παραλαβή μαύρου στερεού σε απόδοση 34%.





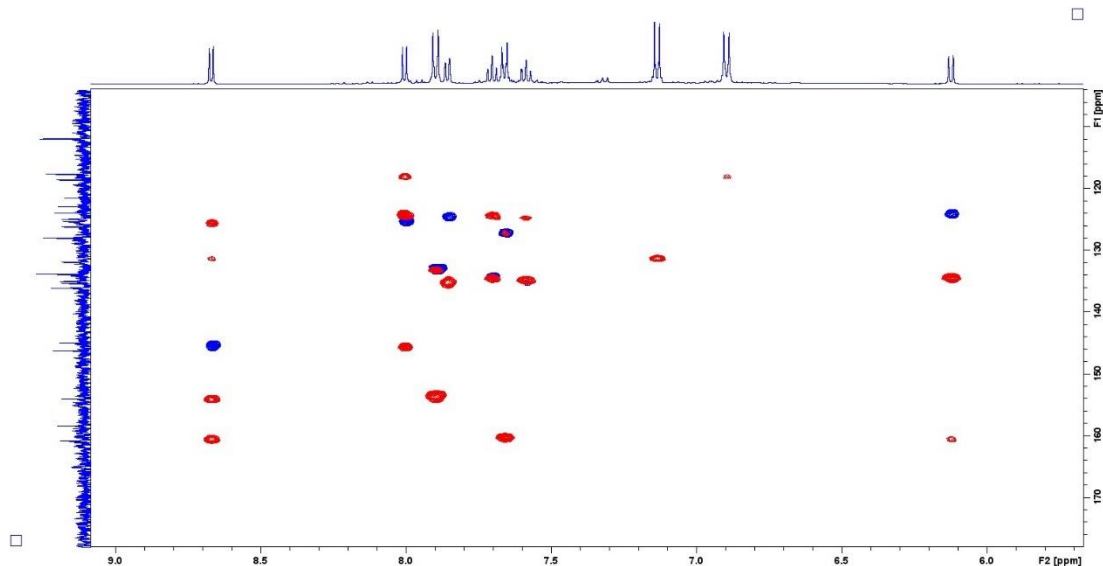
**Εικόνα 33.** Χρωματογράφημα της ένωσης 3. Διαφαιίνεται η κορυφή στα 10,5 min, η οποία αντιστοιχεί στο επιθυμητό προϊόν.

### Ταυτοποίηση της ένωσης 3



**Εικόνα 34.** Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της ένωσης 3 σε διαλύτη DMSO-d<sub>6</sub> (500 MHz, 25 °C).

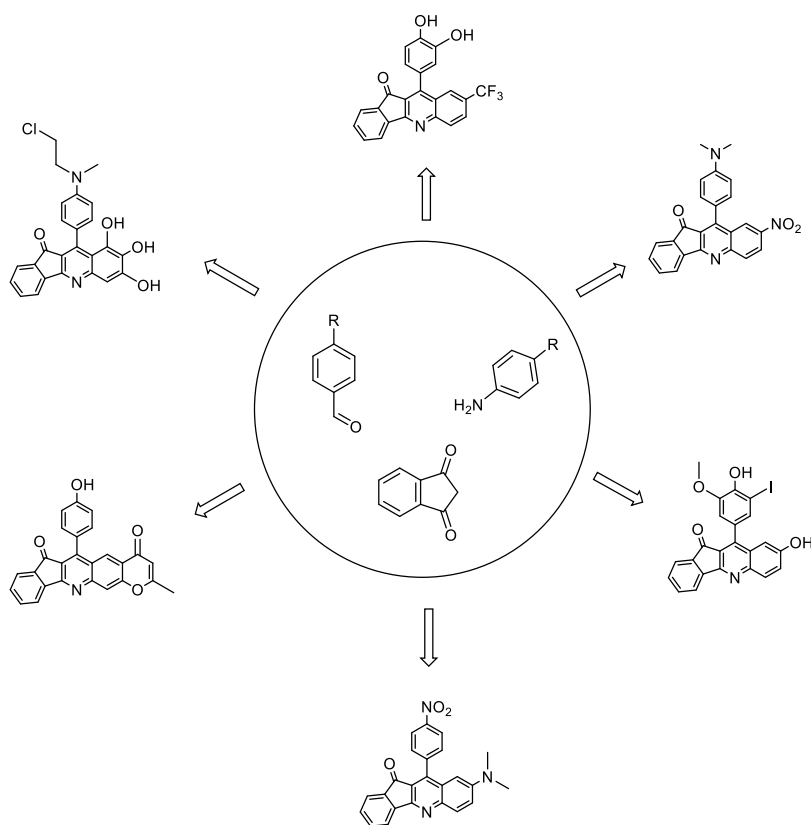
**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO):** δ 10.61 (s, 1H, OH-30), 8.67 (d, J = 6.8 Hz, 1H, H-19), 8.00 (d, J = 6.8 Hz, 1H, H-20), 7.90 (d, J = 9.1 Hz, 2H, H-22 και H-26), 7.86 (dt, J = 7.3, 0.9 Hz, 1H, H-5), 7.70 (td, J = 7.5, 0.9 Hz, 1H, H-7), 7.66 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-15), 7.59 (td, J = 7.7, 1.2 Hz, 1H, H-6), 7.13 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-18 και H-16), 6.90 (d, J = 9.1 Hz, 2H, H-23 και H-25), 6.12 (dt, J = 7.8, 0.8 Hz, 1H, H-8), 3.13 (s, 6H, H-28 και H-29).



**Εικόνα 35.** Υπέρθυση φασμάτων 2D  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  HSQC (μπλε)-HMBC (κόκκινο) της ένωσης 3 σε  $\text{DMSO}-d^6$  (500 MHz, 25 °C).

### Παρατηρήσεις

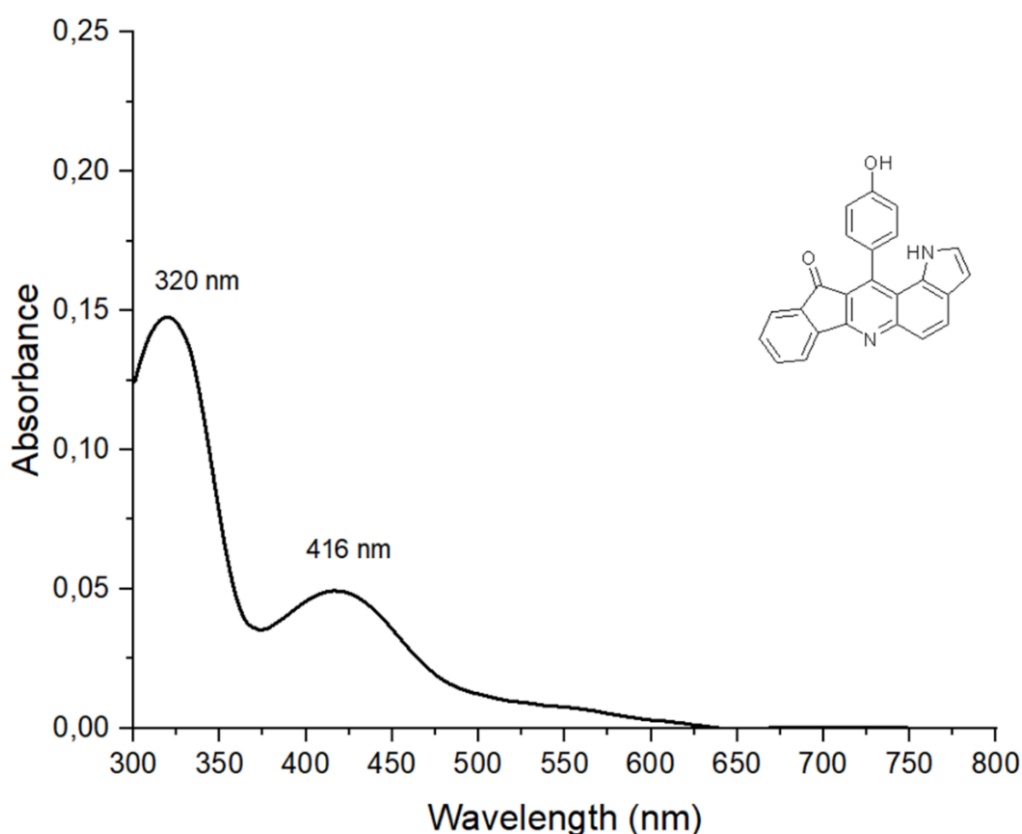
Παρατηρούμε πως για την ένωση 3, όπως και για την ένωση 2, η σύνθεση ήταν επιτυχής, αλλά με το συνθετικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε η απόδοση δεν είναι η αναμενόμενη. Η απόδοση της εν λόγω σύνθεσης είναι ακόμα χαμηλότερη για άλλα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν (κάτω του 10%). Τα διάφορα υποστρώματα και οι ενώσεις που δοκιμάστηκαν να συντεθούν, παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα, ωστόσο δεν κατέστη εφικτό να γίνει απομόνωση και ταυτοποίηση κάποιου προϊόντος.



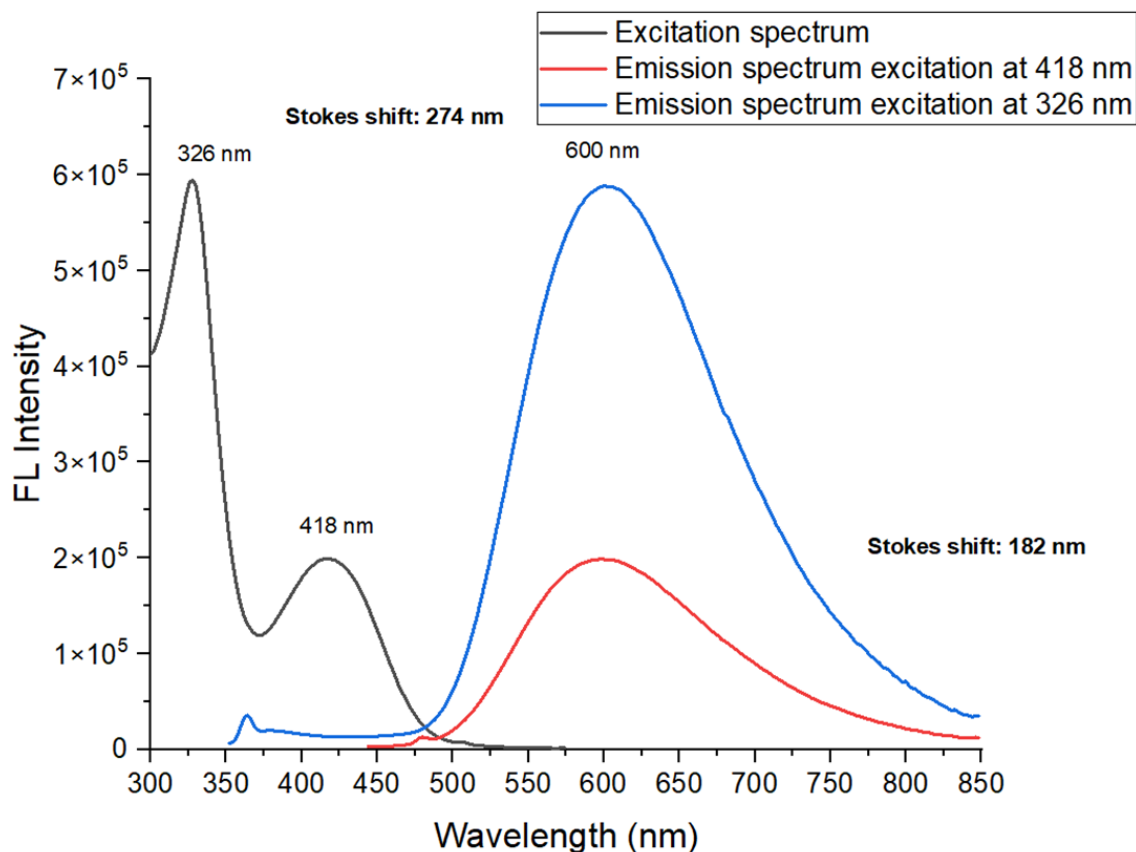
**Εικόνα 36.** Σχηματική αναπαράσταση των αναλόγων για τα οποία έγινε προσπάθεια σύνθεσης με χρήση μικροκυμάτων.

### 2.1.3 Φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης 2

Προκειμένου να αξιολογήσουμε τις φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης **2**, πραγματοποιήσαμε πειράματα, τόσο με φασματοσκοπία UV-Vis, όσο και φασματοσκοπία φθορισμού. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις απορρόφησης και φθορισμού της ένωσης **2** σε συνθήκες, στις οποίες η ένωση είναι πλήρως διαλυτή, όπως το DMSO. Παρατηρήθηκε, πως αυτή εμφανίζει ένα φάσμα απορρόφησης με δύο διακριτές κορυφές, στα 320 και 416 nm. Επιπρόσθετα, η ένωση **2** διαθέτει ένα μήκος κύματος εκπομπής στα 600 nm με μήκη κύματος διέγερσης στα 326 και 418 nm. Επιπλέον, μπορούμε να παρατηρήσουμε πως με ακτινοβολία στα 326 nm, η ένωση φθορίζει στα 600 nm πιο έντονα συγκριτικά με την ακτινοβολία στα 418 nm. Από τις τιμές αυτές συμπεραίνουμε πως η ένωση **2** αποτελεί μία χρωστική τύπου push-pull (ώθησης-έλξης ηλεκτρονιακής πυκνότητας), η οποία βασίζεται στο ICT φαινόμενο, και εμφανίζει μια μετατόπιση Stokes της τάξης των 274 nm.

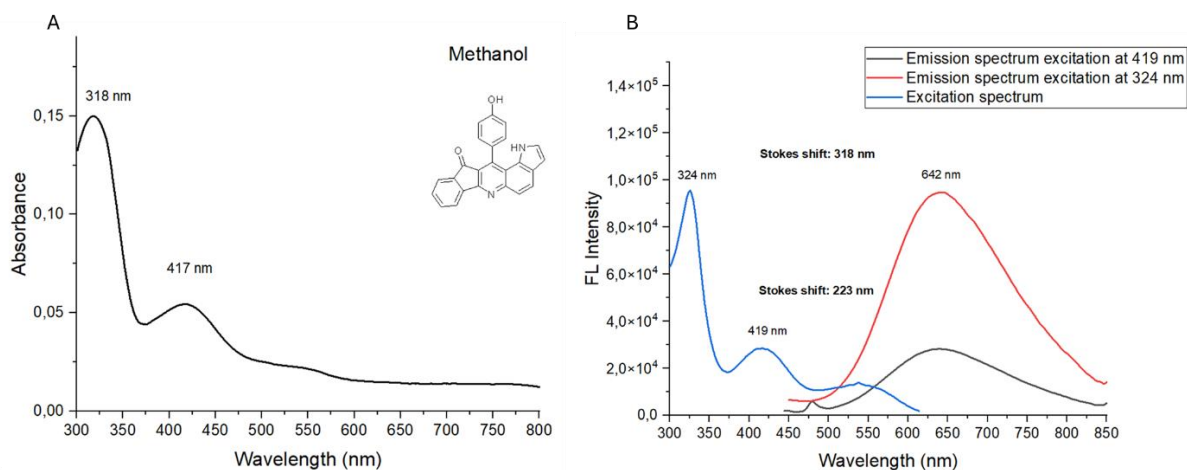


**Εικόνα 37.** Φάσμα απορρόφησης της ένωσης **2** (συγκέντρωσης 10  $\mu\text{M}$ ) σε διαλύτη DMSO και θερμοκρασία 25 °C.

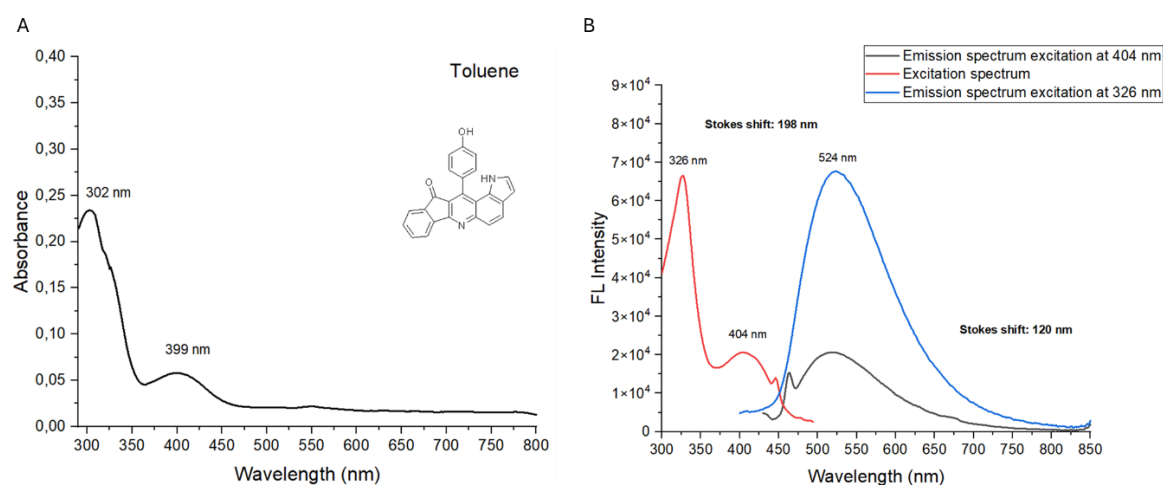


**Εικόνα 38.** Φάσματα διέγερσης και φθορισμού της ένωσης **2** (συγκέντρωσης 10  $\mu\text{M}$ ) σε διαλύτη DMSO και θερμοκρασία 25  $^{\circ}\text{C}$  (step 2, ExBw: 5, EmBw: 5).

Εφόσον η πολικότητα του διαλύτη, στην οποία ευρίσκεται η ένωση, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον φθορισμό της, πραγματοποιήθηκαν πειράματα της ένωσης **2** 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). Συγκεκριμένα, εκτός του διμεθυλοσουλφοξειδίου, το οποίο πρόκειται για έναν πολικό απρωτικό διαλύτη, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις απορρόφησης και φθορισμού σε μεθανόλη (πολικός πρωτικός διαλύτης) και σε τολουόλιο (μη πολικός διαλύτης). Αυτό που παρατηρήθηκε είναι πως σε πιο πολικούς διαλύτες (μεθανόλη και διμεθυλοσουλφοξείδιο) το φάσμα εκπομπής είναι μετατοπισμένο σε μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με τον μη πολικό (τολουόλιο).



**Εικόνα 39.** Φάσμα απορρόφησης (A) και φάσματα διέγερσης και φθορισμού (B) της ένωσης **2** (συγκέντρωσης 10  $\mu$ M) σε διαλύτη μεθανόλη, σε θερμοκρασία 25 °C (step 2, ExBw: 5, EmBw: 5).

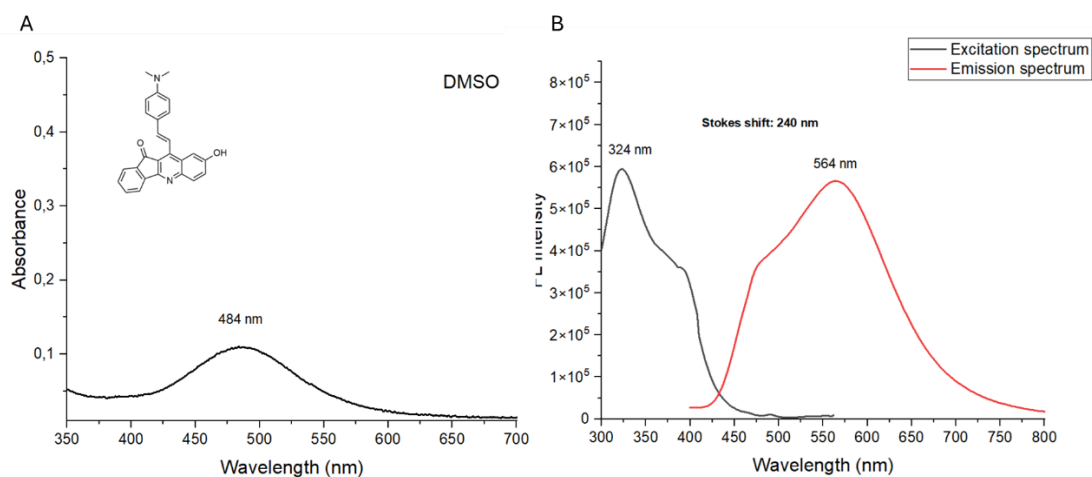


**Εικόνα 40.** Φάσμα απορρόφησης (A) και φάσματα διέγερσης και φθορισμού (B) της ένωσης **2** (συγκέντρωσης 10  $\mu$ M) σε διαλύτη τολουόλιο, σε θερμοκρασία 25 °C (step 2, ExBw: 5, EmBw: 5).

#### Συμπέρασμα:

Παρατηρούμε πως βάσει των πειραμάτων φθορισμού, η ένωση **2** είναι ένας φθορίζων πυρήνας κοντά στην περιοχή NIR. Εξαιτίας των πολύ μεγάλων τιμών μετατόπισης Stokes μπορούμε εύλογα να υποθέσουμε ότι η ένωση αυτή φθορίζει μέσω του φαινομένου ICT. Μένει να διαπιστωθεί και αν άλλες ενώσεις παρόμοιες με αυτή διαθέτουν και παρόμοιες φωτοφυσικές ιδιότητες. Για αυτόν τον λόγο ελέγχθηκε και η ένωση **3** ως προς αυτές τις ιδιότητες.

### 2.1.4 Φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης 3



**Εικόνα 41.** Φάσμα απορρόφησης (A) και φάσματα διέγερσης και φθορισμού (B) της ένωσης **3** (συγκέντρωσης 10  $\mu$ M) σε διαλύτη DMSO, σε θερμοκρασία 25 °C (step 2, ExBw: 5, EmBw: 5).

Παρατηρούμε πως η ένωση **3** εμφανίζει ένα μέγιστο απορρόφησης στα 484 nm και με διέγερση στα 324 nm δίνει ένα μέγιστο σήμα φθορισμού στα 564 nm, με μετατόπιση Stokes της τάξης των 240 nm. Μπορούμε και σε αυτήν την περίπτωση να υποθέσουμε ότι η ένωση **3** φθορίζει λόγω του ICT φαινομένου.

---

## Συμπεράσματα-Συζήτηση Αποτελεσμάτων

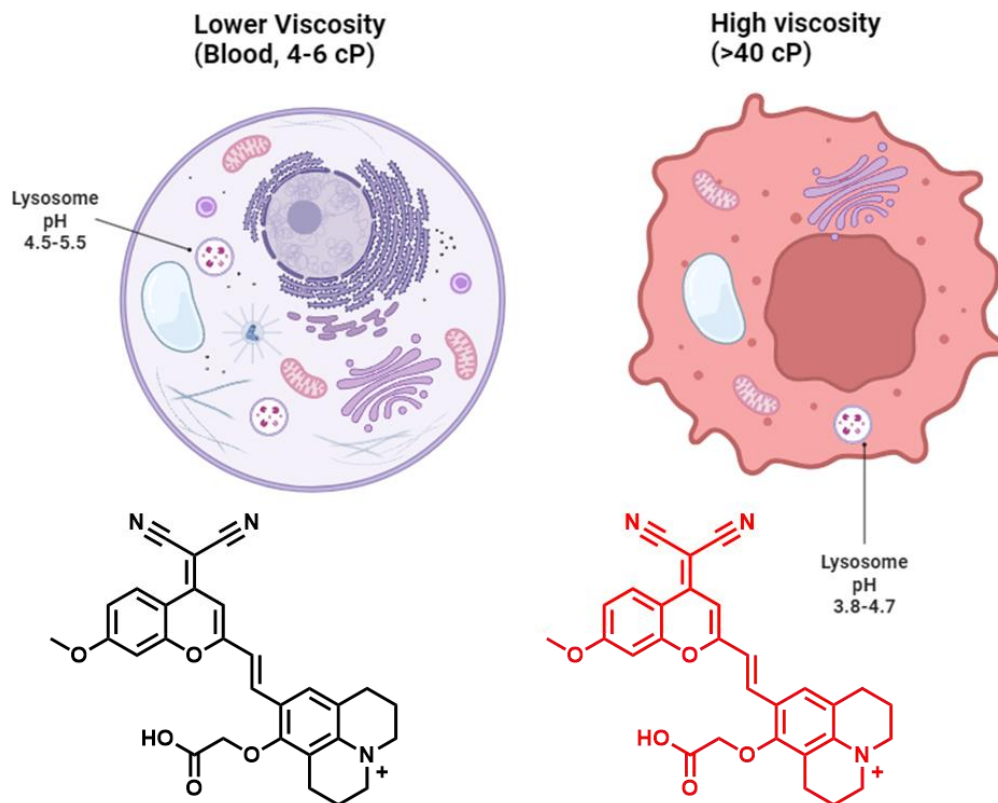
---

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο της εν λόγω μεταπτυχιακής διατριβής έγινε προσπάθεια σύνθεσης αναλόγων ινδενοπυριδίνης, μέσω πολυσυστατικών αντιδράσεων σε ένα βήμα. Η σύνθεση των αναλόγων αυτών με χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας αποδείχτηκε εφικτή σε ορισμένα υποστρώματα, αλλά παρόλα αυτά με χαμηλές αποδόσεις, σε αντιδιαστολή με βιβλιογραφικά δεδομένα, που αναφέρουν αποδόσεις της τάξης του 95-99%. Δεν διαλευκάνθηκε ο λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό και απαιτούνται περισσότερα πειράματα για να επιτευχθεί αυτό. Παρόλα αυτά, από την μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων των ενώσεων, οι οποίες συντέθηκαν επιτυχώς για πρώτη φορά και δεν έχουν αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία (Ενώσεις 2 και 3), διαπιστώνουμε πως αυτές μπορούν να αποτελέσουν χρωστικές για την περαιτέρω ανάπτυξη διαγνωστικών μορίων, καθώς έχουν τη δυνατότητα να φθορίζουν κοντά στην περιοχή του Εγγύς Υπερύθρου. Εκτός των τροποποιήσεων στη δομή των ήδη συντιθέμενων ενώσεων, οι ίδιες αυτές οι ενώσεις μπορεί να αξιολογηθούν για την αντικαρκινική τους δράση ως έχει, καθώς η δομή τους είναι αρκετά υποσχόμενη.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

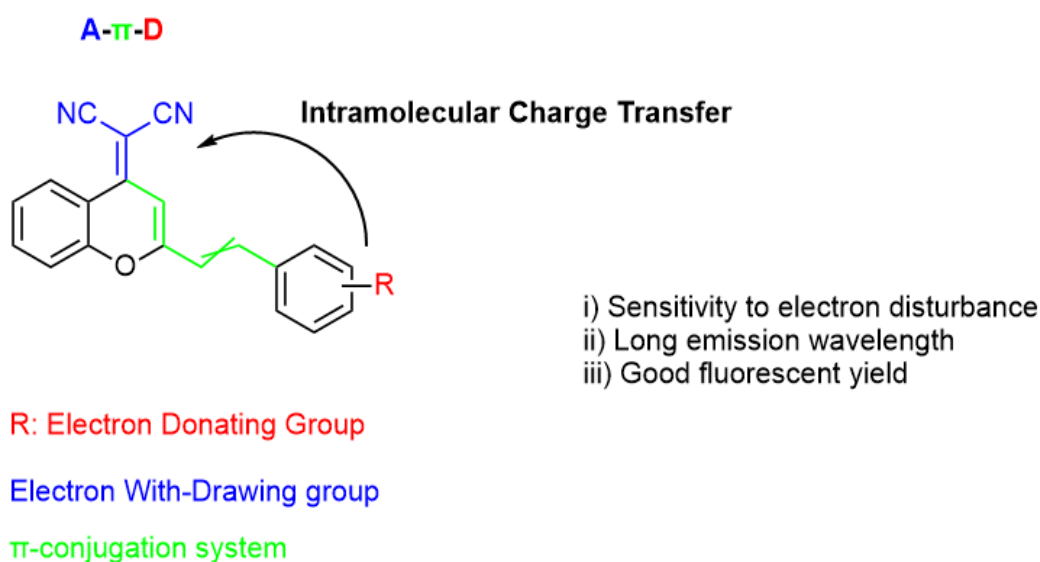
Σύνθεση, χαρακτηρισμός και αξιολόγηση μιας νέας διαγνωστικής ένωσης που ανταποκρίνεται στο καρκινικό περιβάλλον και μιας θεραπευτικής ένωσης, που αποτελεί προφάρμακο της δοξορουβικίνης



### 3.1 Σχεδιασμός, σύνθεση και αξιολόγηση μίας διαγνωστικής ένωσης, που στοχεύει και ανταποκρίνεται στο καρκινικό μικροπεριβάλλον

#### 3.1.1 Ορθολογικός σχεδιασμός

Στο υποκεφάλαιο αυτό πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας NIR χρωστικής ένωσης, η οποία ανταποκρίνεται σε μεταβολές του ιξώδους και θα μπορούσε εν δυνάμει, να ανταποκρίνεται και στο μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων. Η εν λόγω χρωστική ανήκει στην κατηγορία των χρωστικών του δικυανομεθυλένο-4H-πυρανίου (Dicyanomethylene-4H-pyran, DCM). Επιλέχθηκε ο εν λόγω φθορίζων παράγοντας, καθώς χρωστικές αυτής της κατηγορίας παρουσιάζουν εξαιρετικές φωτοφυσικές και φωτοχημικές ιδιότητες, όπως μεγάλη μετατόπιση Stokes, εξαιρετική φωτοσταθερότητα και έντονη εκπομπή στην περιοχή NIR. Οι χρωστικές αυτές διαθέτουν ένα σύστημα, που αποτελείται από δότη ηλεκτρονίων (donor, D), ο οποίος επικοινωνεί μέσω π-συζυγιακού συστήματος με έναν δέκτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας (acceptor, A), και συνήθως φθορίζουν λόγω του φαινομένου ενδομοριακής μεταφοράς φορτίου (ICT). Στον σκελετό της εν λόγω χρωστικής, τον ρόλο του δέκτη ηλεκτρονίων κυρίως διαδραματίζει η νιτριλο-ομάδα, ενώ του δότη κάποιο τμήμα που συνδέεται με τη μεθυλο-ομάδα της χρωστικής. [85]



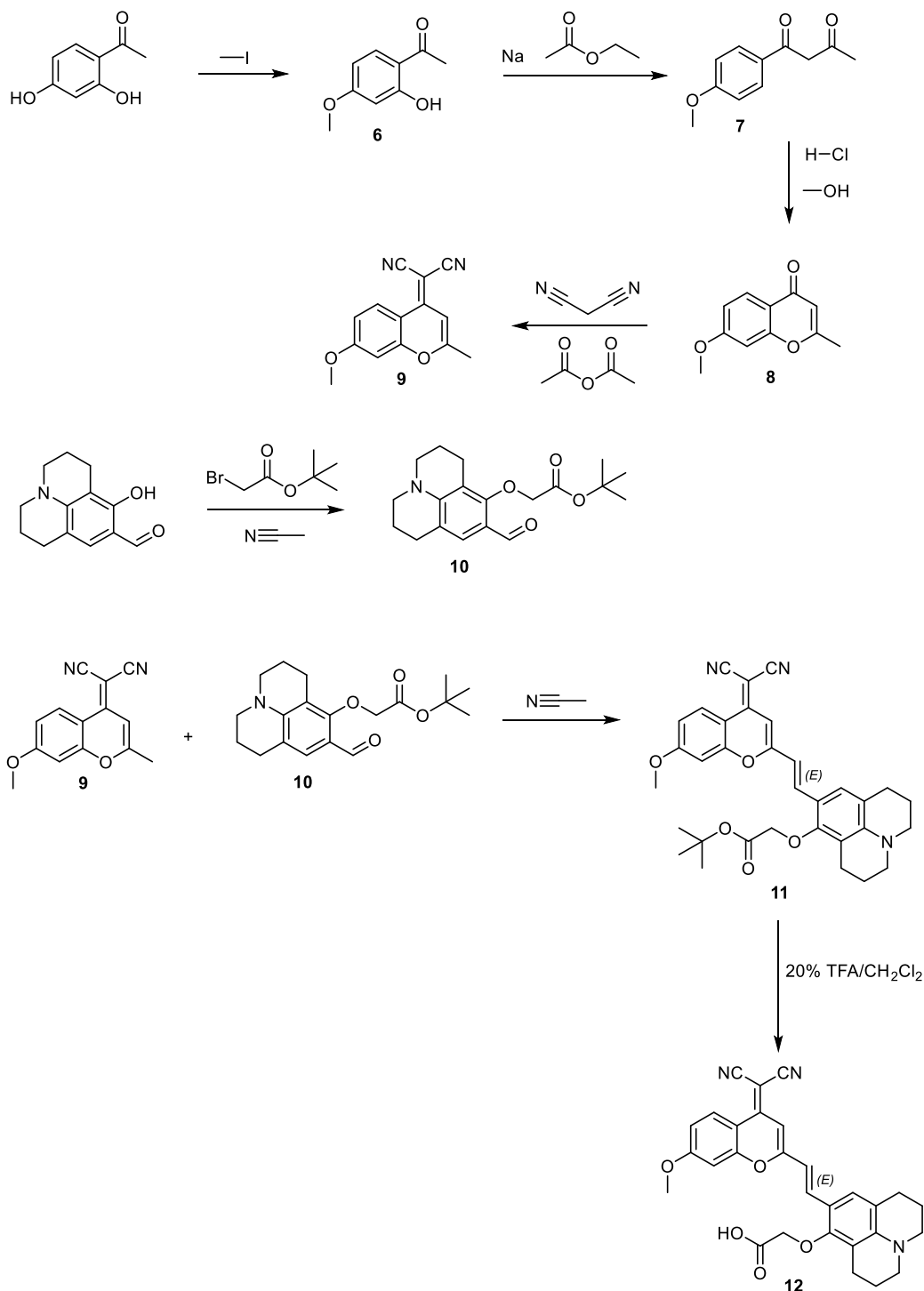
**Εικόνα 42.** Η γενική δομή της χρωστικής DCM που χρησιμοποιήθηκε και το φαινόμενο ICT, που εμφανίζει.

Για την συγκεκριμένη ένωση που συντέθηκε, χρησιμοποιήθηκε μία ελαφρώς τροποποιημένη εκδοχή της χρωστικής DCM, ώστε να βελτιωθούν οι φωτοφυσικές της ιδιότητες. Σε αυτήν λοιπόν τη χρωστική προσαρτήθηκε η 8-υδροξυ-2,3,6,7-τετραϋδρο-1H,5H-πυριδο[3,2,1-ij]-κινολινο-9-καρβαλδεΰδη, η οποία διαθέτει:

A) Ομάδα **δότη ηλεκτρονίων** μία υποκατεστημένη **τριτοταγή αμίνη**, η οποία εν δυνάμει μπορεί και να αποτελέσει παράγοντα στόχευσης των λυσοσωμάτων του κυττάρου. Αυτό συμβαίνει, καθώς οι τριτοταγείς αμίνες, οι οποίες έχουν ένα άτομο αζώτου συνδεδεμένο με τρεις ομάδες αλκυλο- ή αρυλο-ομάδες, μπορούν να πρωτονιωθούν στο όξινο περιβάλλον των λυσοσωμάτων, εκμεταλλευόμενες τη βαθμίδωση του pH κατά μήκος της μεμβράνης αυτών, με το εσωτερικό των λυσοσωμάτων να είναι πιο όξινο (pH περίπου 4,5-5,0) σε σύγκριση με

το κυτταρόπλασμα (pH περίπου 7,2). Συμπερασματικά, οι τριτοταγείς αμίνες είναι λιπόφιλες και μπορούν εύκολα να διασχίσουν τις κυτταρικές μεμβράνες. Μόλις εισέλθουν στα λυσοσώματα, πρωτονιώνονται λόγω του χαμηλού pH, οδηγώντας στην κατακράτηση τους μέσα στο λυσοσωμικό διαμέρισμα, λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με την αρνητικά φορτισμένη λυσοσωμική μεμβράνη. [86]

B) Μια **υδροξυλομάδα**, στην οποία δύνανται να γίνουν περαιτέρω τροποποιήσεις. Η τελική ένωση που προέκυψε φέρει μία καρβοξυλική ομάδα, η οποία είναι αρκετά χρήσιμη για μια πληθώρα αντιδράσεων, όπως για παράδειγμα για μια σύζευξη με κάποιον κυτταροτοξικό παράγοντα-φάρμακο.

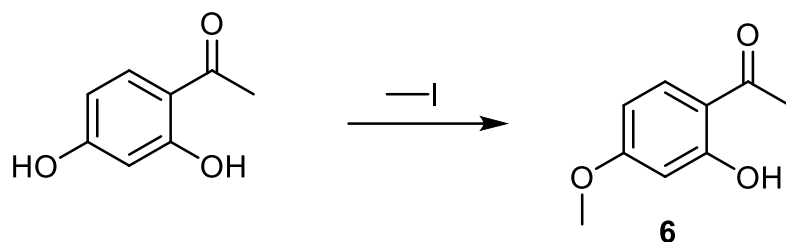


**Εικόνα 43.** Συνθετική πορεία της ένωσης 12. Αντιδραστήρια και Διαλύτες: (α) Ιωδομεθάνιο, άνυδρη Ακετόνη, 56 °C, 15 ώρες, (β) Μεταλλικό νάτριο, άνυδρος οξικός αιθυλεστέρας, r.t, 6 ώρες, (γ) HCl, MeOH, r.t, 4 ώρες, (δ) Μαλονονιτρίλιο, οξικός ανυδρίτης, 139 °C, 12 ώρες, (ε) Ακετονιτρίλιο, βρωμοοξικός-τριτ-βουτυλεστέρας, ανθρακικό κάλιο, 82 °C, 5 ώρες, (στ) Ακετονιτρίλιο, πιπεριδίνη, 82 °C, 7 ώρες, (ζ) 20% τριφθοροοξικό οξύ σε διχλωρομεθάνιο, r.t, 3 ώρες.

Η σύνθεση του φθοροφόρου πυρήνα (Ένωση 9) πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας βιβλιογραφικές αναφορές. [87]

### 3.1.2 Συνθετική πορεία

#### Σύνθεση της ένωσης 6



**Εικόνα 44.** Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 6

#### Πειραματική πορεία

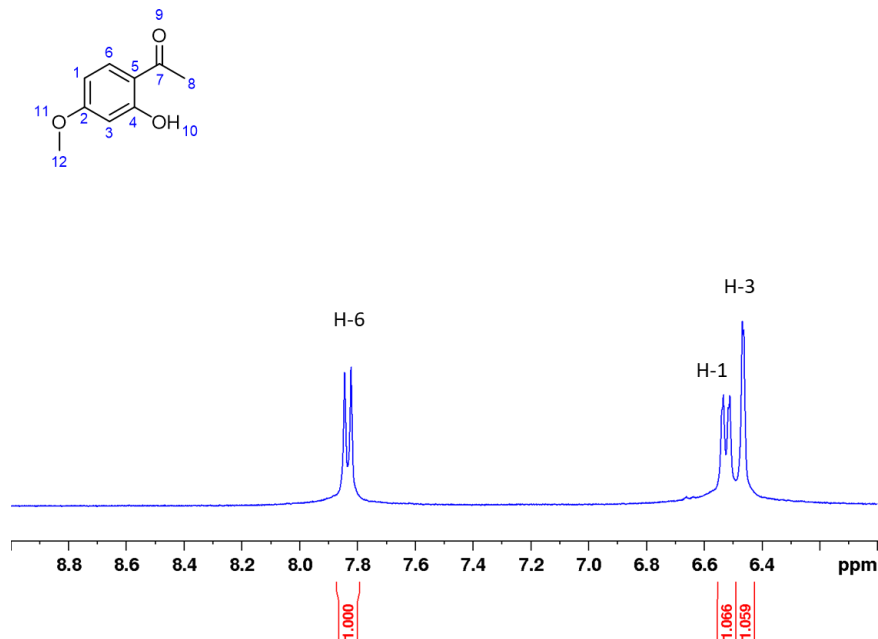
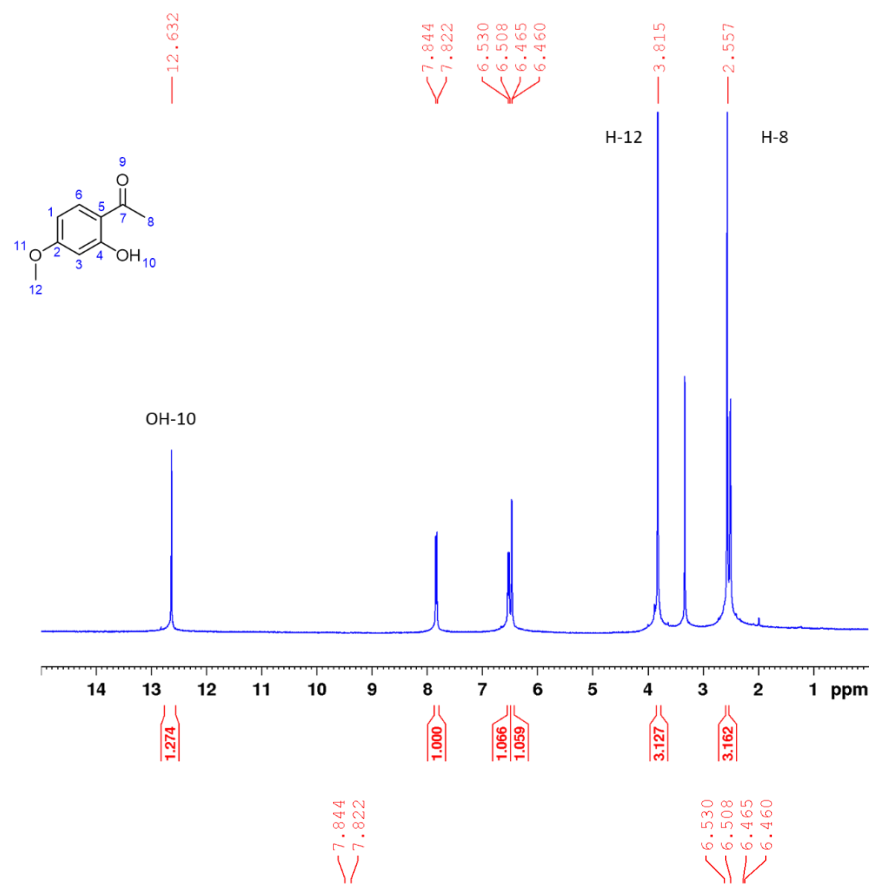
Σε διάλυμα της 1-(2,4-διυδροξύ φαίνυλο)αιθαν-1-όνης (5 g, 0,032 mol) σε ακετόνη ακολούθησε η προσθήκη του ιωδομεθανίου (3,86 ml, 0,048 mol) στάγδην με σταγονομετρικό χωνί υπό άνυδρες συνθήκες N<sub>2</sub>, καθώς επίσης προστέθηκε και ανθρακικό κάλιο (6,6 g, 0,038 mol). Το αντιδρών μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση με θέρμανση υπό αναρροή (56 °C) για 15 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών ανάπτυξης 30% v/v οξικό αιθυλεστέρα σε εξάνιο, όπου διαπιστώθηκε η κατανάλωση των αντιδρώντων. Ακολούθησε προσθήκη νερού στο αντιδρών μίγμα προς εξουδετέρωση της ενδεχόμενης περίσσειας ιωδομεθανίου. Έπειτα, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Ακολούθησε εκχύλιση με διαλύτες οξικό αιθυλεστέρα (2x 200 ml) και νερό. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και ξηράθηκε με άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και στη συνέχεια ο διαλύτης απομακρύνθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Η απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (Silica gel) σε σύστημα διαλυτών έκλουσης οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο. Το κίτρινο ελαιώδες προϊόν απομονώθηκε σε ποσοστό 2,5% v/v οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο με απόδοση 91% (4,84 g).

#### Πιθανός μηχανισμός της εν λόγω αντίδρασης

Η αντίδραση ηλεκτρονιόφιλης μεθυλίωσης αποτελεί μια πυρηνόφιλη προσβολή τύπου S<sub>N</sub>2 της φαينوλικής υδροξυλομάδας στο ιωδομεθάνιο, το οποίο λειτουργεί ως ηλεκτρονιόφιλο.

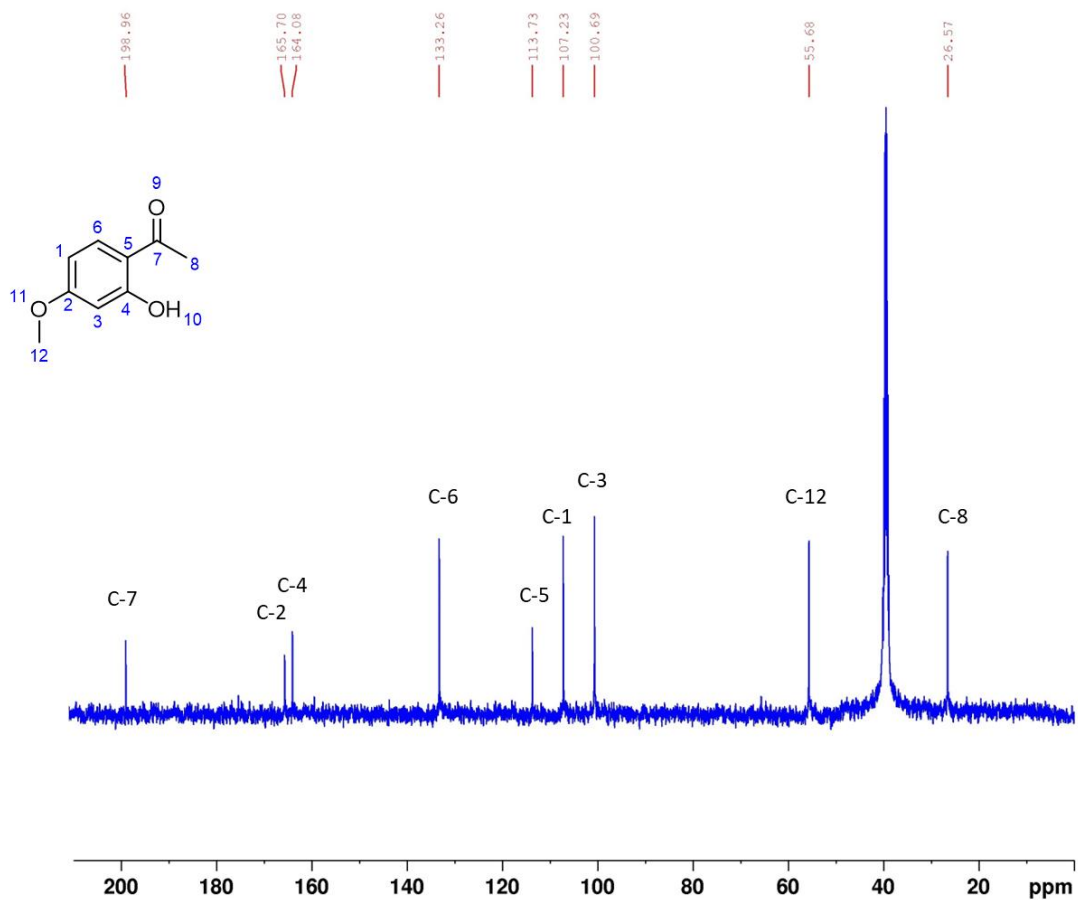
#### Ταυτοποίηση της ένωσης 6

Ακολουθεί ταυτοποίηση της ένωσης 6 με φασματοσκοπία NMR <sup>1</sup>H και <sup>13</sup>C.



**Εικόνα 45.** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 6 με έμφαση στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων, σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  (400 MHz, 25 °C).

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO):**  $\delta$  12.63 (s, 1H, OH-10), 7.83 (dt,  $J = 8.9, 1.5$  Hz, 1H, H-6), 6.52 (dt,  $J = 8.8, 2.2$  Hz, 1H, H-1), 6.46 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H, H-3), 3.82 (s, 3H, H-12), 2.56 (s, 3H, H-8).



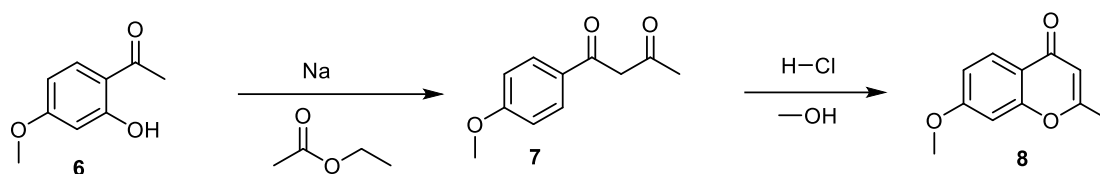
**Εικόνα 46.** Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 6 σε διαλύτη  $\text{DMSO}-d^6$  (101 MHz, 25 °C).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO):  $\delta$  198.96 (C-7), 165.70 (C-2), 164.08 (C-4), 133.27 (C-6), 113.73 (C-5), 107.24 (C-1), 100.69 (C-3), 55.68 (C-12), 26.57 (C-8).

Παρατηρήσεις:

Η σύνθεση της ένωσης 6 κρίνεται επιτυχής, καθώς η κορυφή στα 3.82 ppm οφείλεται σε πρωτόνια μεθυλο-ομάδας και υποδηλώνει τη μεθυλίωση της υδροξυλομάδας.

### Σύνθεση των ενώσεων 7 και 8



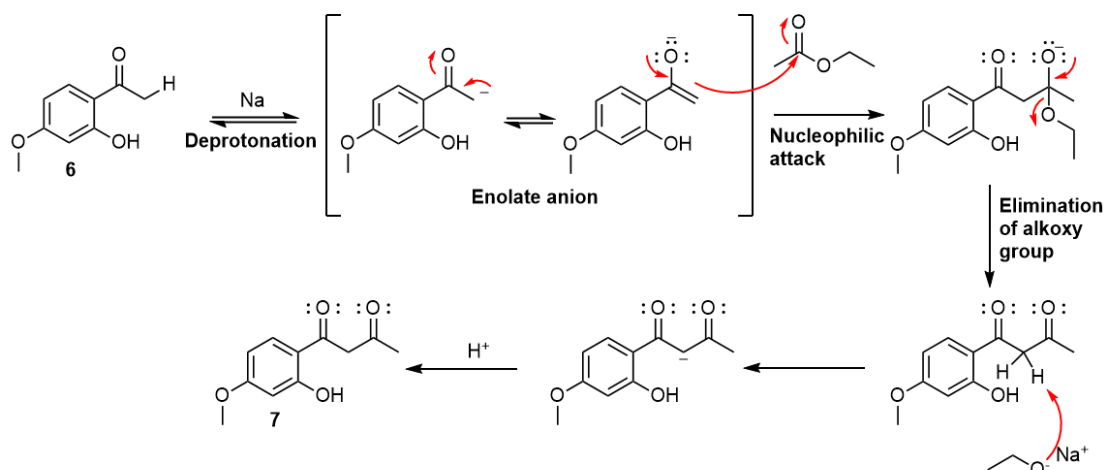
**Εικόνα 47.** Αντίδραση σχηματισμού των ενώσεων 7 και 8

### Πειραματική πορεία

Η ένωση 6 (4,8 g, 0,029 mol) τοποθετήθηκε σε κατάλληλη σφαιρική φιάλη και προστέθηκε ο οξικός αιθυλεστέρας ως διαλύτης. Ακολούθησε προσθήκη του μεταλλικού νατρίου (3,19 g, 0,145 mol), το οποίο διαδραματίζει τον ρόλο της βάσης. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 6 ώρες. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών ανάπτυξης 30% v/v οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο, όπου παρατηρήθηκε σχεδόν πλήρης κατανάλωση των αντιδρώντων. Ακολούθησε εξουδετέρωση της περίσσειας Na με διαδοχική προσθήκη μεθανόλης, αιθανόλης και νερού, υπό πάγο. Οι πτητικοί διαλύτες εξατμίστηκαν σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό και το υδατικό υπόλειμμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέχθηκαν και ξηράθηκαν με άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και συμπυκνώθηκαν με εξατμισμό υπό υψηλό κενό, για να παραληφθεί στερεό, το οποίο δεν ταυτοποιήθηκε και πιθανώς ταυτίζεται με την ένωση 7.

Το στερεό αυτό επιδιαλυτώθηκε με προσθήκη 20 ml μεθανόλης. Στο διάλυμα αυτό ακολούθησε προσθήκη 2 ml διαλύματος πυκνού υδροχλωρικού οξέος και το αντιδρών μίγμα αναδεύτηκε υπό θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών ανάπτυξης 40% v/v οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο, όπου διαπιστώθηκε η πλήρης κατανάλωση του αντιδρώντος. Η απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (Silica gel) σε σύστημα διαλυτών έκλουσης οξικού αιθυλεστέρα/εξανίου. Το πορτοκαλί ελαιώδες προϊόν, ένωση 8, απομονώθηκε σε ποσοστό 35% v/v οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο, με απόδοση 62% (3,42 g).

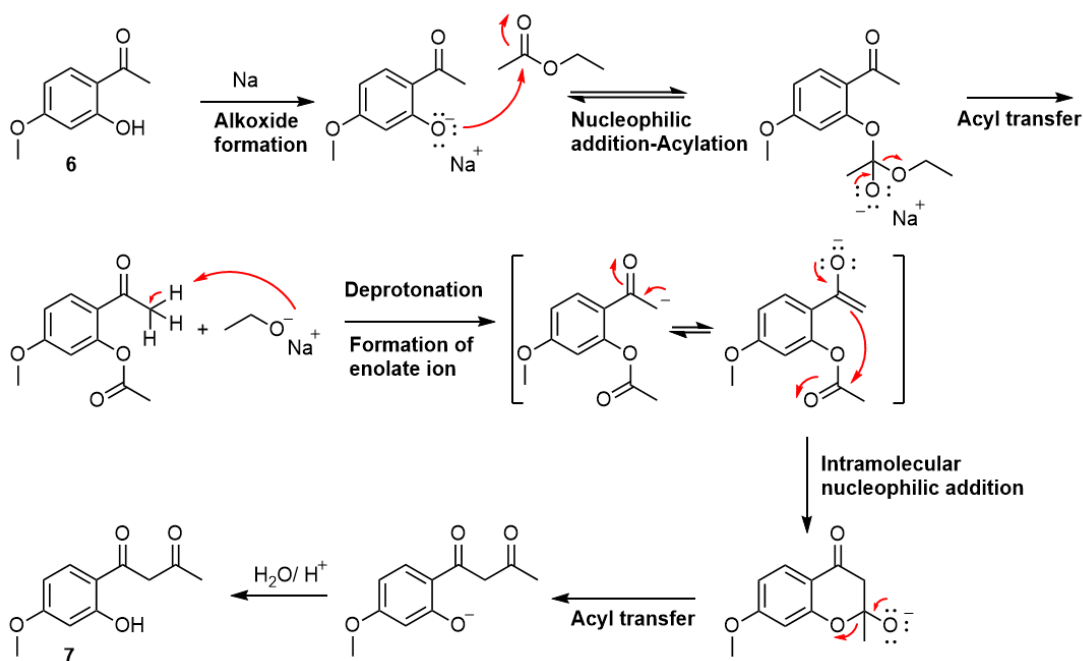
### Πιθανός μηχανισμός της εν λόγω αντίδρασης



**Εικόνα 48.** Αναπαράσταση του προτεινόμενου μηχανισμού σύνθεσης της ένωσης 7 μέσω μιας αντίδρασης συμπύκνωσης Claisen.

Η ένωση 7, η οποία αποτελεί μία β-δικετόνη, προκύπτει από την 1-(2-υδροξυ-4-μεθοξυφαινυλ) αιθαν-1-όνη με μία συμπύκνωση Claisen με τον οξικό αιθυλεστέρα, όπως περιγράφηκε από τον Mozingo και τους συνεργάτες του. Συγκεκριμένα, στο πρώτο στάδιο έχουμε τη δημιουργία ενολοϊόντος, έπειτα από την απόσπαση ενός α-Η της ακετοφαινόνης, το οποίο σταθεροποιείται μέσω δομών συντονισμού. Ακολουθεί η πυρηνόφιλη προσβολή αυτού στον καρβονυλικό άνθρακα του οξικού αιθυλεστέρα και η απόσπαση της αλκοξυομάδας για να προκύψει το αντίστοιχο αλκοξείδιο. Αυτό αποσπάει ένα από τα δύο α-Η με αποτέλεσμα να προκύψει ένα νέο ενολοϊόν, το οποίο σταθεροποιεί και την όλη αντίδραση. Το τελικό στάδιο για να προκύψει η β-δικετόνη, απαιτεί την παρουσία ενός οξέος, το οποίο συγχρόνως εξουδετερώνει και οποιαδήποτε περίσσεια βάσης.

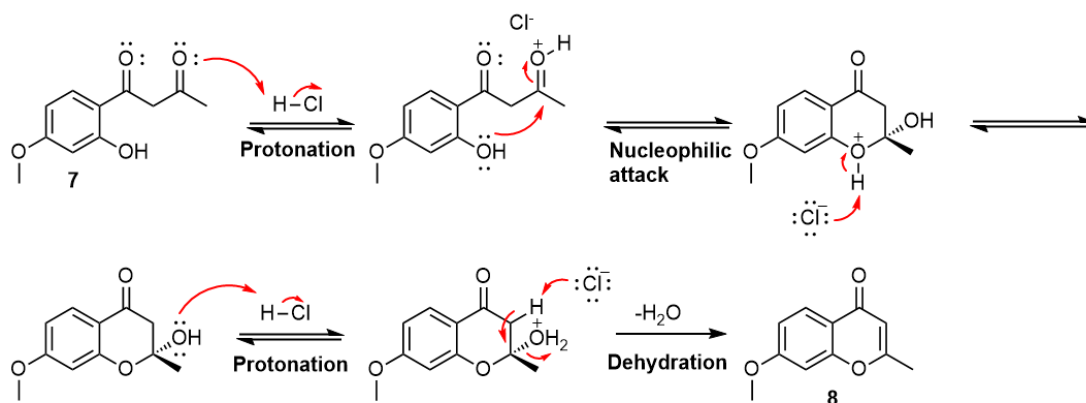
Αξίζει να σημειωθεί πως η ένωση 7 μπορεί να προκύψει και από μία μετάθεση Baker-Venkataraman (αφού έχει προηγηθεί μία αντίδραση ακυλίωσης της φαινολικής υδροξυλομάδας, ώστε να προκύψει ένα ο-ακυλιωμένος φαινολικός εστέρας). Ειδικότερα, τα κρίσιμα στάδια αυτού του μηχανισμού περιλαμβάνουν την δημιουργία ενολοϊόντος, την συμπύκνωση Claisen και την ενδομοριακή μετάθεση μιας ακυλο-ομάδας.



**Εικόνα 49.** Αναπαράσταση του προτεινόμενου μηχανισμού σύνθεσης της ένωσης 7 μέσω μιας αντίδρασης μετάθεσης Baker-Venkataraman.

Η ενδομοριακή κυκλοποίηση της ένωσης 7 παρουσία μεθανόλης και υδροχλωρίου οδηγεί στην ένωση 8. Συγκεκριμένα, αρχικά γίνεται ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσβολή της φαινολικής υδροξυλομάδας στον καρβονυλικό άνθρακα και έπειτα απόσπαση ενός μορίου νερού για να προκύψει ο ολεφινικός δεσμός.

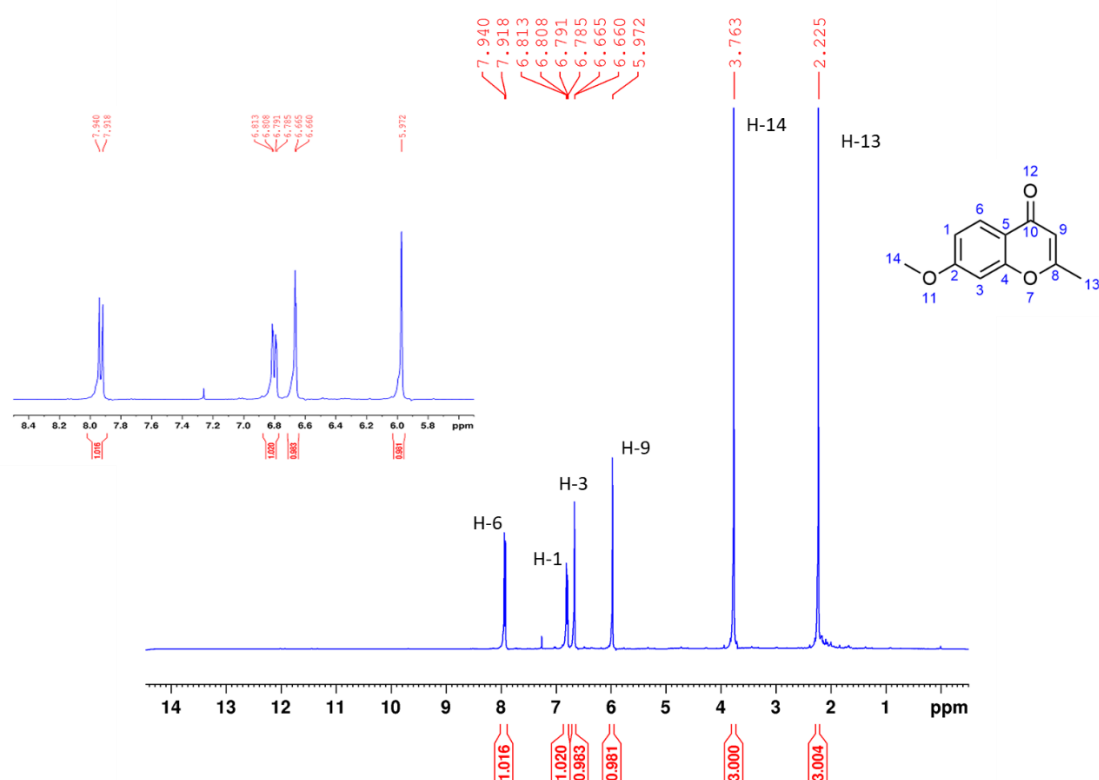




**Εικόνα 50.** Αναπαράσταση του προτεινόμενου μηχανισμού σύνθεσης της ένωσης 8, μέσω μιας ενδομοριακής κυκλοποίησης και αφυδάτωσης.

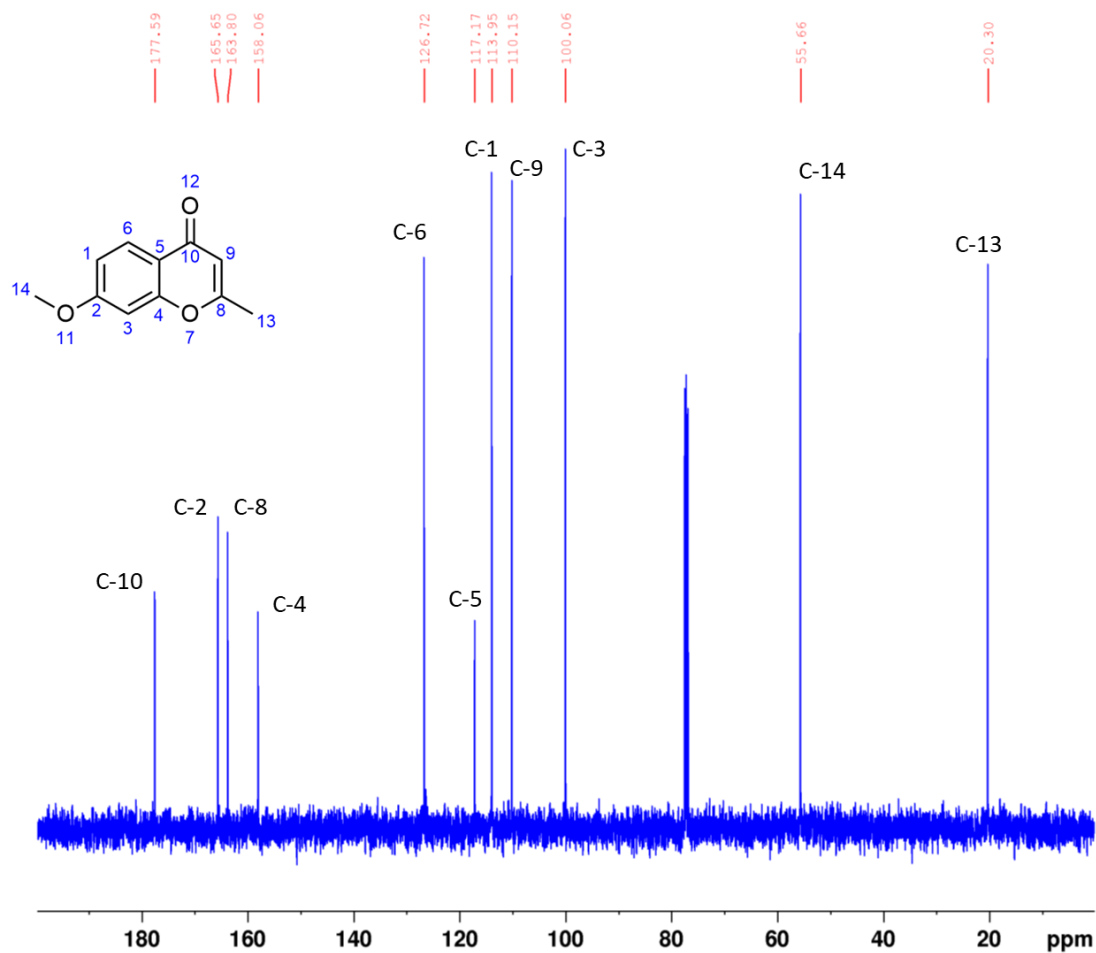
### Ταυτοποίηση της ένωσης 8

Ακολουθεί ταυτοποίηση της ένωσης 8 με φασματοσκοπία NMR <sup>1</sup>H και <sup>13</sup>C.



**Εικόνα 51.** Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της ένωσης 8 σε διαλύτη CDCl<sub>3</sub> (400 MHz, 25 °C).

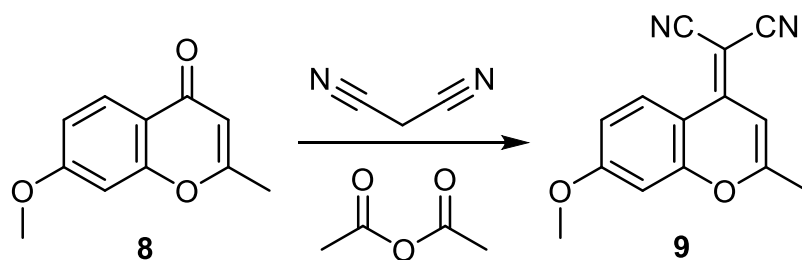
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7.93 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-6), 6.80 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H, H-1), 6.66 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-3), 5.97 (s, 1H, H-9), 3.76 (s, 3H, H-14), 2.23 (s, 3H, H-13).



Εικόνα 52. Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 8 σε διαλύτη  $\text{CDCl}_3$  (101 MHz, 25 °C).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  177.59 (C-10), 165.66 (C-2), 163.80 (C-8), 158.07 (C-4), 126.73 (C-6), 117.17 (C-5), 113.96 (C-1), 110.16 (C-9), 100.06 (C-3), 55.67 (C-14), 20.31 (C-13).

Σύνθεση της ένωσης 9



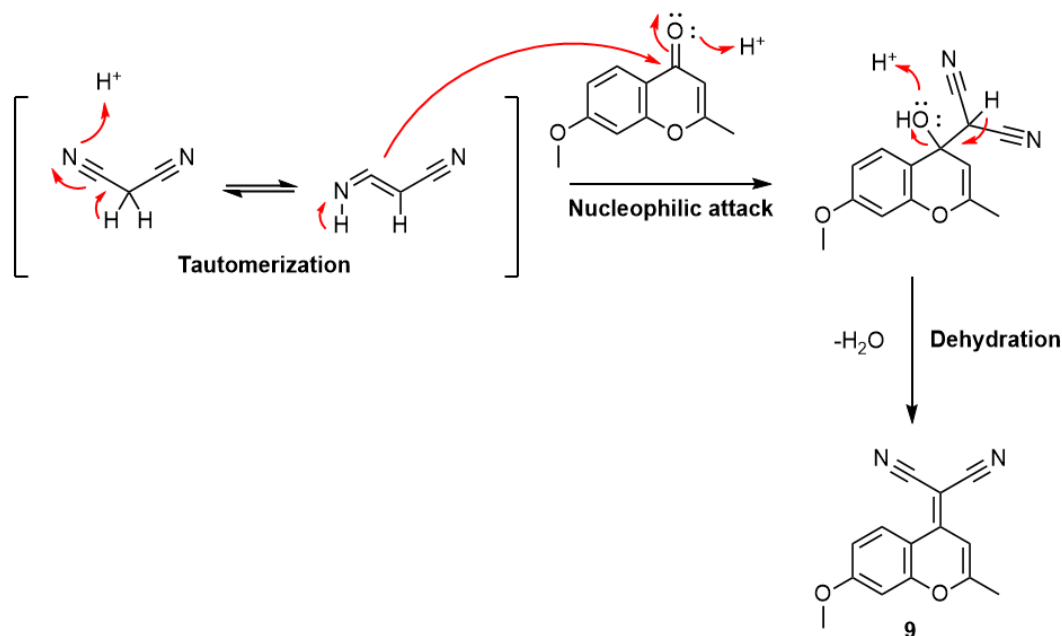
Εικόνα 53. Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 9.

### Πειραματική πορεία

Η ένωση 8 (3,40 g, 0,0179 mol) μεταφέρθηκε σε κατάλληλη σφαιρική φιάλη και σε άνυδρες συνθήκες υπό ροή N<sub>2</sub>, προστέθηκε ο οξικός ανυδρίτης (15 ml). Έπειτα ακολούθησε η προσθήκη του μαλονονιτριλίου (9,9 ml, 0,179 mol) και η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση και θέρμανση υπό αναρροή (139 °C) για 10 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών ανάπτυξης 50% v/v διχλωρομεθάνιο σε εξάνιο. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνθηκε με απόσταξη υπό υψηλό κενό και το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα και νερό. Το προϊόν παραλήφθηκε στην οργανική φάση, η οποία ξηράθηκε υπό άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό περιστροφικό εξατμιστήρα. Η απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος επιτεύχθηκε με χρωματογραφία στήλης (Siliga gel) σε σύστημα διαλυτών έκλουσης διχλωρομεθάνιο σε εξάνιο, όπου έγινε σταδιακή αύξηση της πολικότητας από 20% v/v/ έως και 50% v/v διχλωρομεθανίου σε εξάνιο, όπου και έγινε παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος (κίτρινο στερεό) με απόδοση 43% (1,83 g).

### Πιθανός μηχανισμός της εν λόγω αντίδρασης

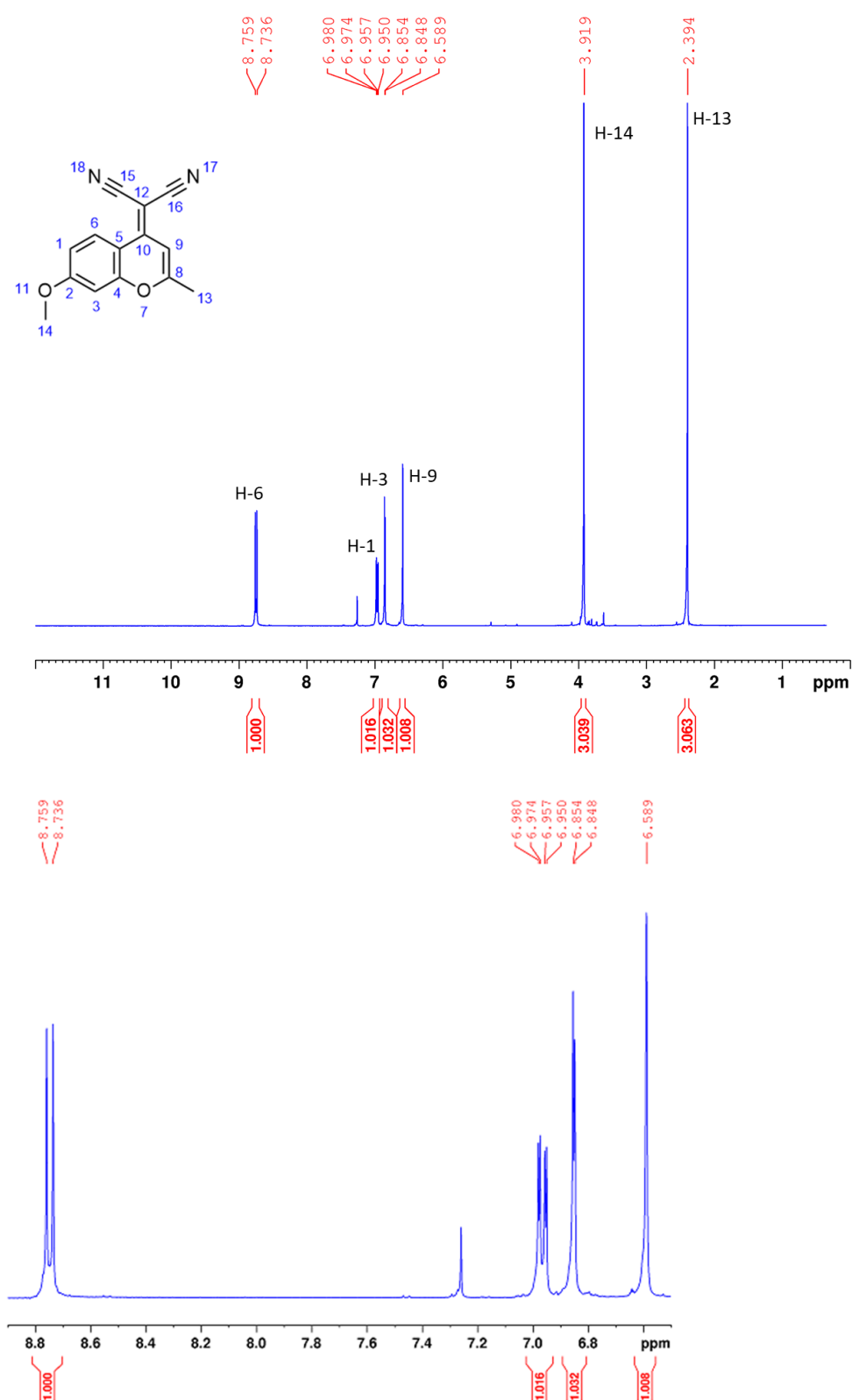
Η ένωση 9 προκύπτει από την ένωση 8, μέσω μιας αντίδρασης συμπύκνωσης σε οξικό ανυδρίτη. Το μαλονονιτρίλιο διαθέτει όξινα α-Η και έτσι μπορεί να λειτουργήσει ως πυρηνόφιλο, το οποίο μπορεί να προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο, λόγω πρωτονίωσης, καρβονυλικό άνθρακα της ένωσης 8. Η προσθήκη της νιτριλο-ομάδας, η οποία λειτουργεί ως πολύ καλός δέκτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας και προσδίδει καλύτερες φωτοφυσικές ιδιότητες στον σκελετό της ένωσης 8, ολοκληρώνεται με απόσπαση ενός μορίου νερού.



**Εικόνα 54.** Αναπαράσταση του προτεινόμενου μηχανισμού σύνθεσης της ένωσης 9, μέσω μιας συμπύκνωσης Knoevenagel.

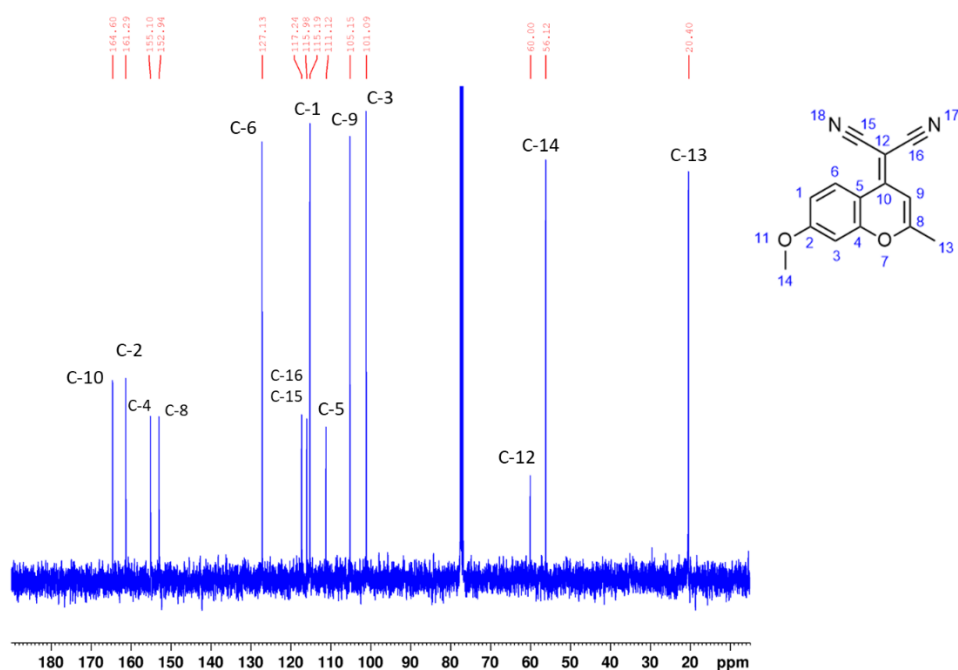
### Ταυτοποίηση της ένωσης 9

Ακολουθεί ταυτοποίηση της ένωσης 9 με φασματοσκοπία NMR  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ .



Εικόνα 55. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 9 σε διαλύτη  $\text{CDCl}_3$  (400 MHz, 25 °C), καθώς και μεγέθυνση του φάσματος στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  8.75 (d,  $J = 9.3$  Hz, 1H, H-6), 6.97 (dd,  $J = 9.3, 2.7$  Hz, 1H, H-1), 6.85 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, H-3), 6.59 (s, 1H, H-9), 3.92 (s, 3H, H-14), 2.39 (s, 3H, H-13).



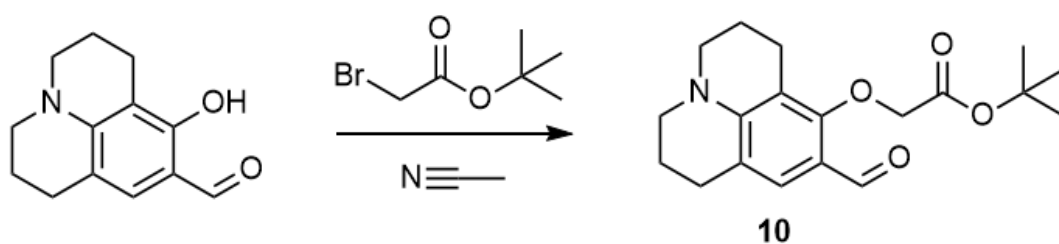
**Εικόνα 56.** Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 9 σε διαλύτη  $\text{CDCl}_3$  (101 MHz, 25 °C).

**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  164.60 (C-10), 161.30 (C-2), 155.10 (C-4), 152.95 (C-8), 127.14 (C-6), 117.24, 115.98 (C-15 και C-16), 115.19 (C-1), 111.12 (C-5), 105.15 (C-9), 101.10 (C-3), 60.01 (C-12), 56.13 (C-14), 20.40 (C-13).

Παρατηρήσεις:

Σύμφωνα με τα φάσματα NMR παρατηρούμε ότι η σύνθεση της ένωσης 9 ήταν επιτυχής. Αυτό επιβεβαιώνεται αρχικά από το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR, αφού τα H-6 και H-9 της ένωσης 9 εμφανίζονται απεντοπισμένα σε μεγαλύτερες τιμές χημικής μετατόπισης (8.75 και 6.59 αντίστοιχα) σε σχέση με τις τιμές των H αυτών στην ένωση 8 (7.93 και 5.97), γεγονός που οφείλεται στην ενσωμάτωση της νιτριλο-ομάδας. Επιπλέον, στο φάσμα  $^{13}\text{C}$  της ένωσης 9 παρατηρούμε την εμφάνιση νέων κορυφών στα 60 και 115-117 ppm, γεγονός που και αυτό υποδηλώνει την επιτυχία της αντίδρασης.

### Σύνθεση της ένωσης 10



**Εικόνα 57.** Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 10.

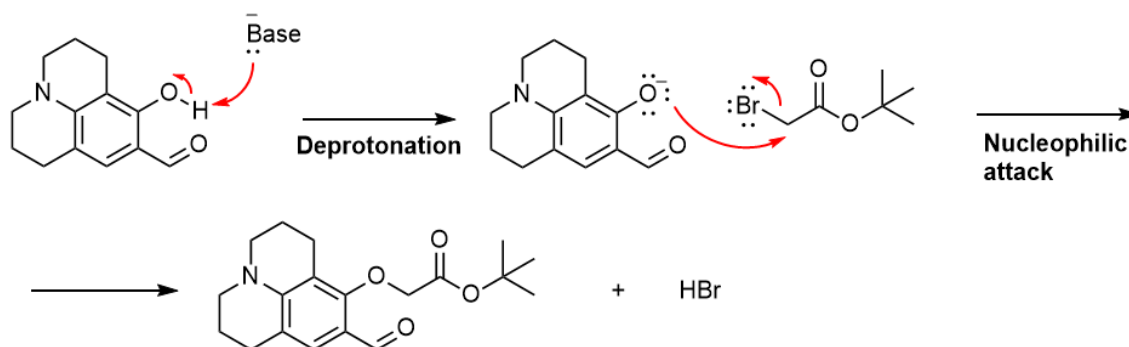
### Πειραματική πορεία

Σε σφαιρική φιάλη των 25 ml μεταφέρθηκε η 8-υδροξυ-2,3,6,7-τετραϋδρο-1H,5H-πυριδο[3,2,1-ij]-κινολινο-9-καρβαλδεϋδη (200 mg, 0,9205 mmol), καθώς επίσης και το ακετονιτρίλιο (6 ml) ως διαλύτης. Έπειτα, ακολούθησε η προσθήκη του βρωμοοξικού τριτ-βουτυλεστέρα (204  $\mu$ L, 1,3808 mmol) και του ανθρακικού καλίου (318 mg, 2,3016 mmol), που λειτουργεί ως βάση. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση με θέρμανση υπό αναρροή (82 °C) για 5 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε σύστημα διαλυτών ανάπτυξης 2% v/v μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο. Εφόσον παρατηρήθηκε πλήρης κατανάλωση των αντιδραστηρίων, ο διαλύτης απομακρύνθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό και το υπόλειμμα εκχυλίστηκε με διχλωρομεθάνιο/νερό. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και ξηράθηκε με άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Το κόκκινο ελαιώδες προϊόν, που προέκυψε (280 mg, 93%), δεν περιείχε προσμίξεις ή παραπροϊόντα και για αυτό χρησιμοποιήθηκε σε παρακάτω αντίδραση, χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Παρατήρηση: Η αντίδραση αφήνεται υπό θέρμανση, ώστε να καταστραφεί ο ενδομοριακός δεσμός H, που υφίσταται μεταξύ της καρβονυλομάδας και του φαινολικού H, για να ευνοηθεί η υποκατάσταση. Επίσης, η αντίδραση αυτή επιλέχθηκε, ώστε να είναι προστατευμένη η φαινολική υδροξυλομάδα για το επόμενο βήμα, της συμπύκνωσης.

### Πιθανός μηχανισμός της εν λόγω αντίδρασης

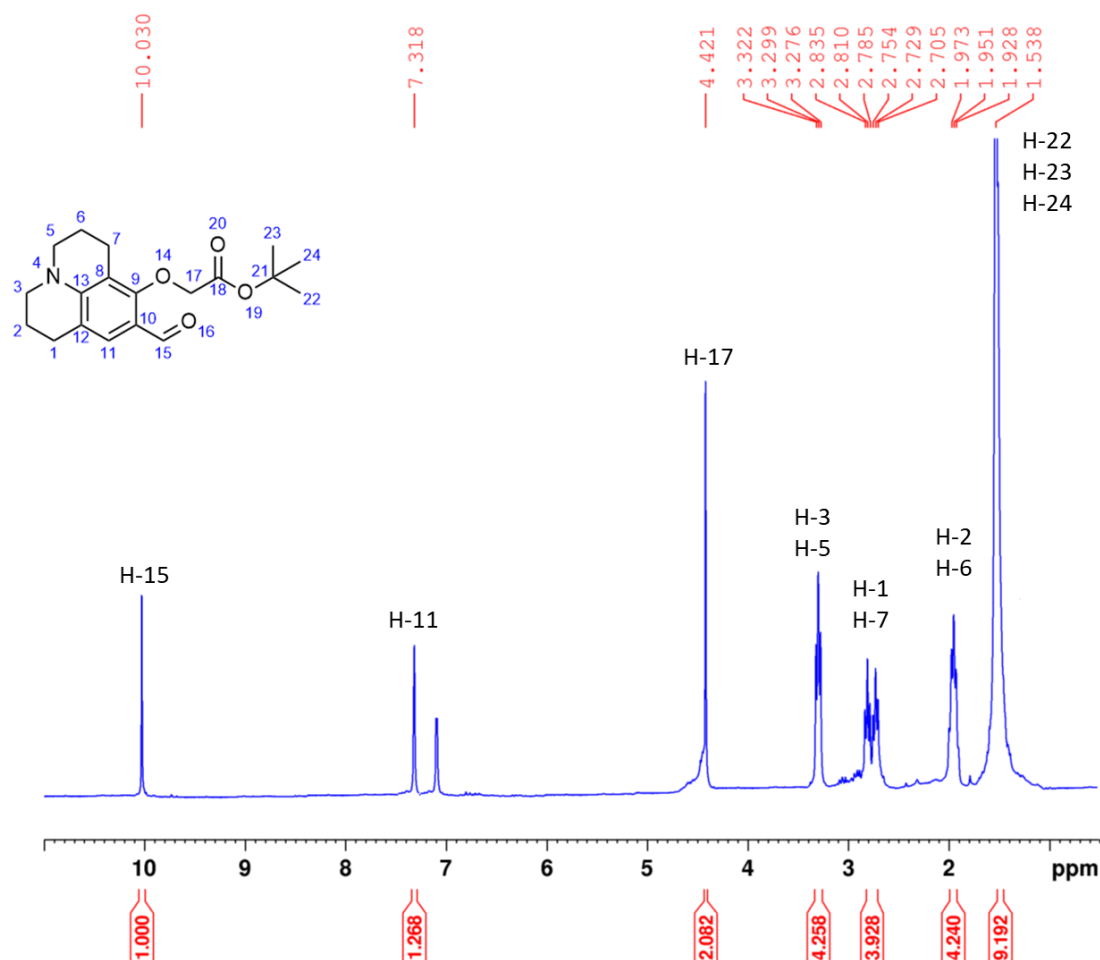
Η σύνθεση της ένωσης 10 πραγματοποιείται μέσω μιας αντίδρασης πυρηνόφιλης υποκατάστασης  $\text{S}_{\text{N}}2$ .



**Εικόνα 58.** Αναπαράσταση του προτεινόμενου μηχανισμού σύνθεσης της ένωσης 10, μέσω μιας πυρηνόφιλης υποκατάστασης.

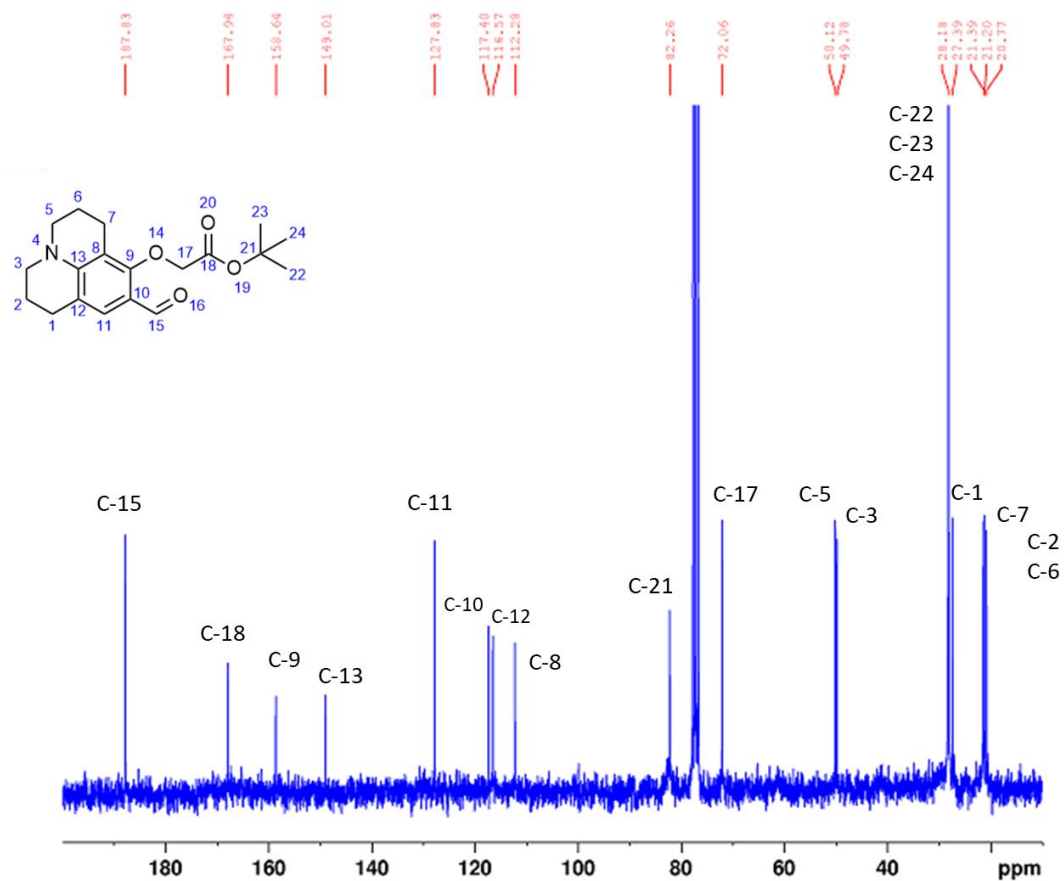
Ταυτοποίηση της ένωσης 10

Ακολουθεί η ταυτοποίηση της ένωσης 10 με φασματοσκοπία NMR  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ .



Εικόνα 59. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 10 σε διαλύτη  $\text{CDCl}_3$  (250 MHz, 25 °C).

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  10.03 (s, 1H, H-15), 7.32 (s, 1H, H-11), 4.42 (s, 2H, H-17), 3.30 (t,  $J = 5.8$  Hz, 4H, H-3 και H-5), 2.98 – 2.50 (m, 4H, H-1 και H-7), 1.95 (p,  $J = 6.4$  Hz, 4H, H-2 και H-6), 1.54 (s, 9H, H-22 και H-23 και H-24).

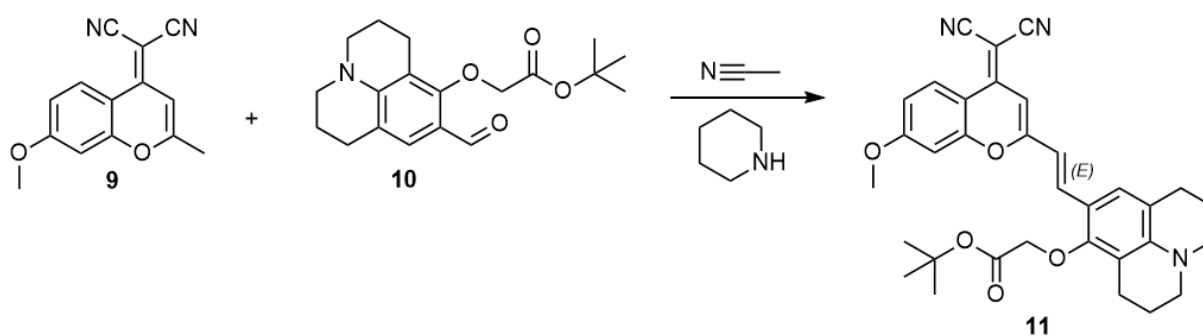


Εικόνα 60. Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 10 σε διαλύτη  $\text{CDCl}_3$  (63 MHz, 25 °C).

$^{13}\text{C}$  NMR (63 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  187.84 (C-15), 167.95 (C-18), 158.64 (C-9), 149.02 (C-13), 127.84 (C-11), 117.40 (C-10), 116.58 (C-12), 112.28 (C-8), 82.26 (C-21), 72.06 (C-17), 50.12 (C-5), 49.78 (C-3), 28.18 (C-22, C-23, C-24), 27.39 (C-1), 21.39 (C-7), 21.21, 20.77 (C-2, C-6).



### Σύνθεση της ένωσης 11



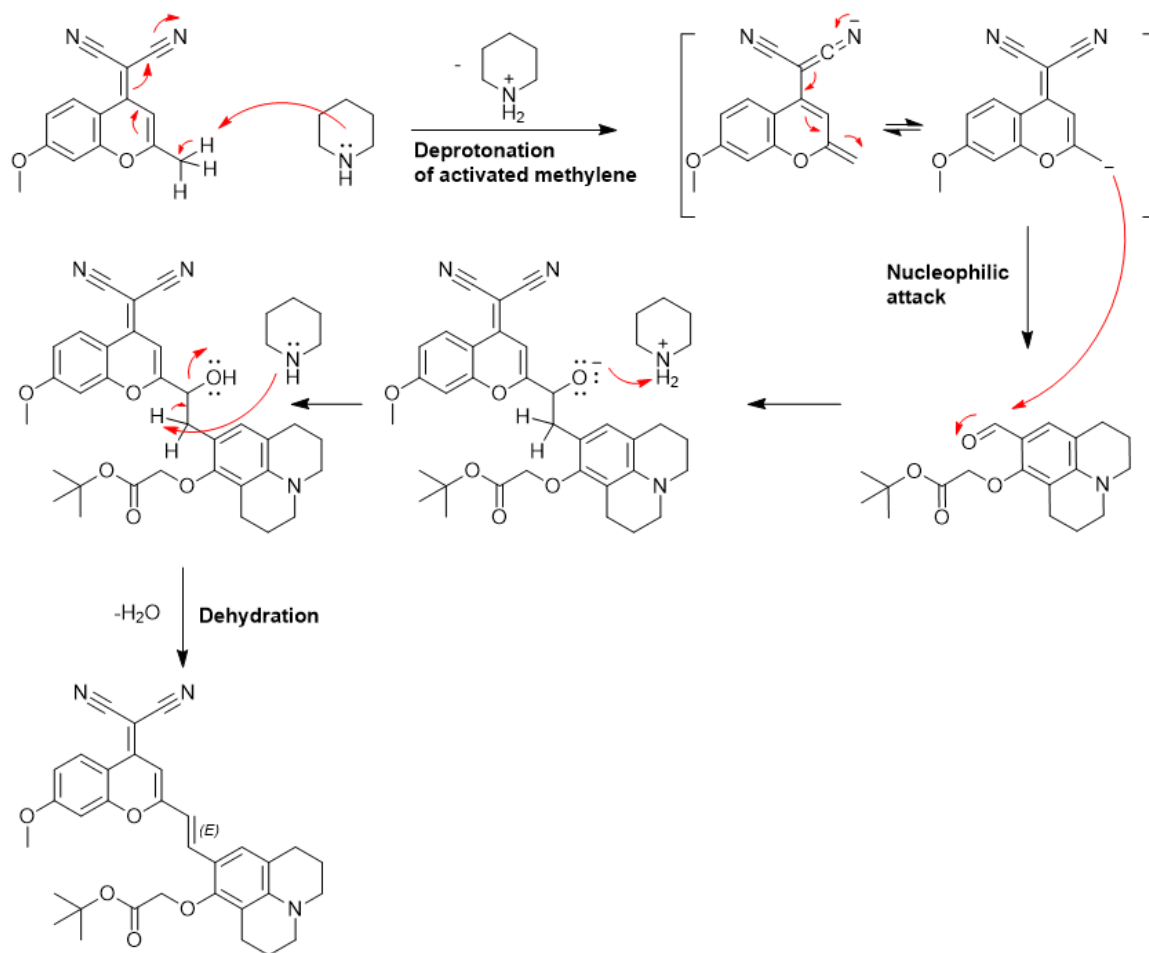
**Εικόνα 61.** Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 11.

### Πειραματική πορεία

Σε σφαιρική φιάλη των 25 ml τοποθετήθηκε η ένωση 10 (250 mg, 0,7546 mmol) και η ένωση 9 (180 mg, 0,7546 mmol). Ακολούθησε η προσθήκη του ακετονιτριλίου (6 ml) ως διαλύτη, καθώς επίσης και της πυριδίνης (7,5  $\mu$ L, 0,0755 mmol) ως βάση. Το αντιδρών μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση με θέρμανση υπό αναρροή (82 °C) για 7 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών ανάπτυξης 2,5% v/v μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ακολούθησε εξάτμιση του διαλύτη και της βάσης υπό υψηλό κενό και η απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (Silica gel) σε σύστημα διαλυτών έκλουσης μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο. Η έκλουση του επιθυμητού προϊόντος (μαύρο-πράσινο στερεό) πραγματοποιήθηκε σε ποσοστό πολικότητας 1,5% v/v μεθανόλης σε διχλωρομεθάνιο, με απόδοση 73% (304 mg).

### Πιθανός μηχανισμός της εν λόγω αντίδρασης

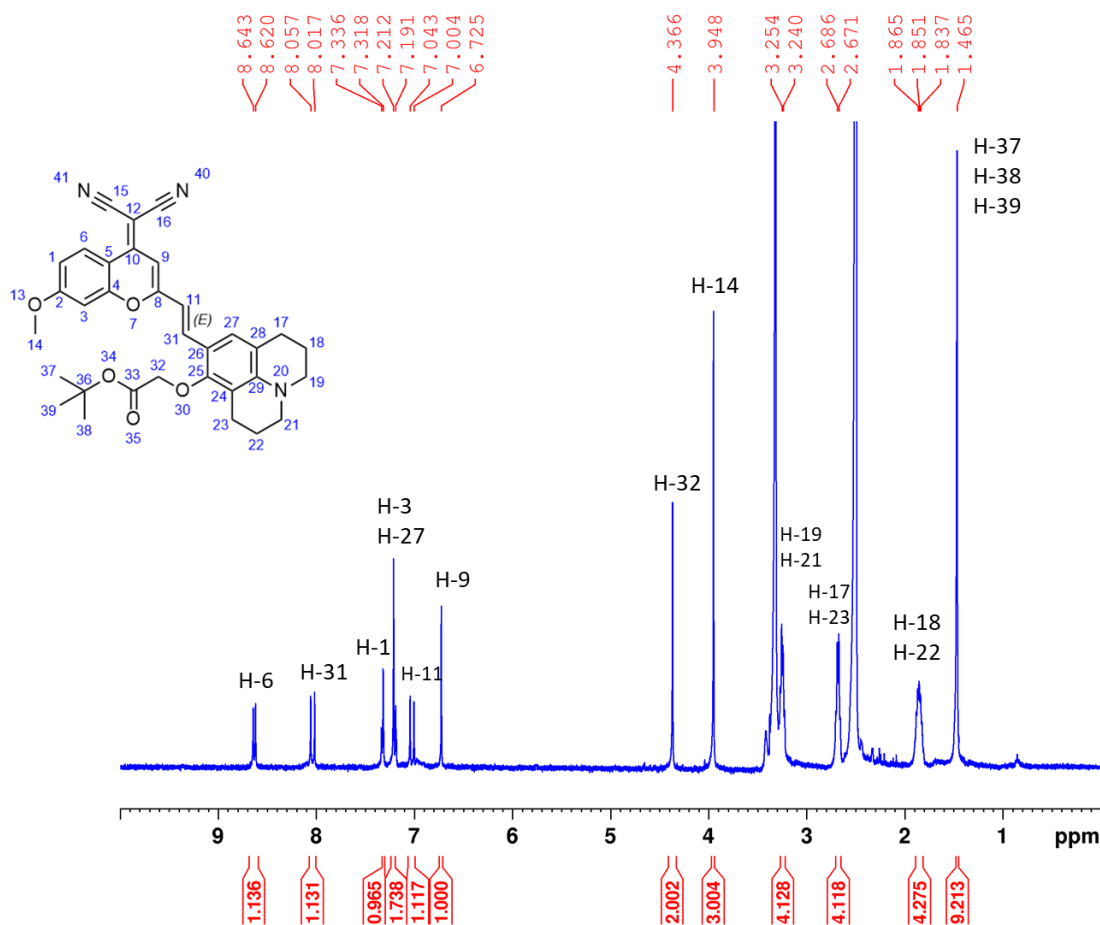
Η σύνθεση της ένωσης 11 λαμβάνει χώρα μέσω μιας αντίδρασης συμπύκνωσης Knoevenagel, καταλυόμενης από βάση, μεταξύ του  $\alpha$ -άνθρακα της ένωσης 9 και του καρβονυλικού άνθρακα της ένωσης 10.



**Εικόνα 62.** Αναπαράσταση του προτεινόμενου μηχανισμού σύνθεσης της ένωσης 11, μέσω μιας συμπύκνωσης Knoevenagel.

Ταυτοποίηση της ένωσης 11

Ακολουθεί η ταυτοποίηση της ένωσης 11 με φασματοσκοπία NMR  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ .

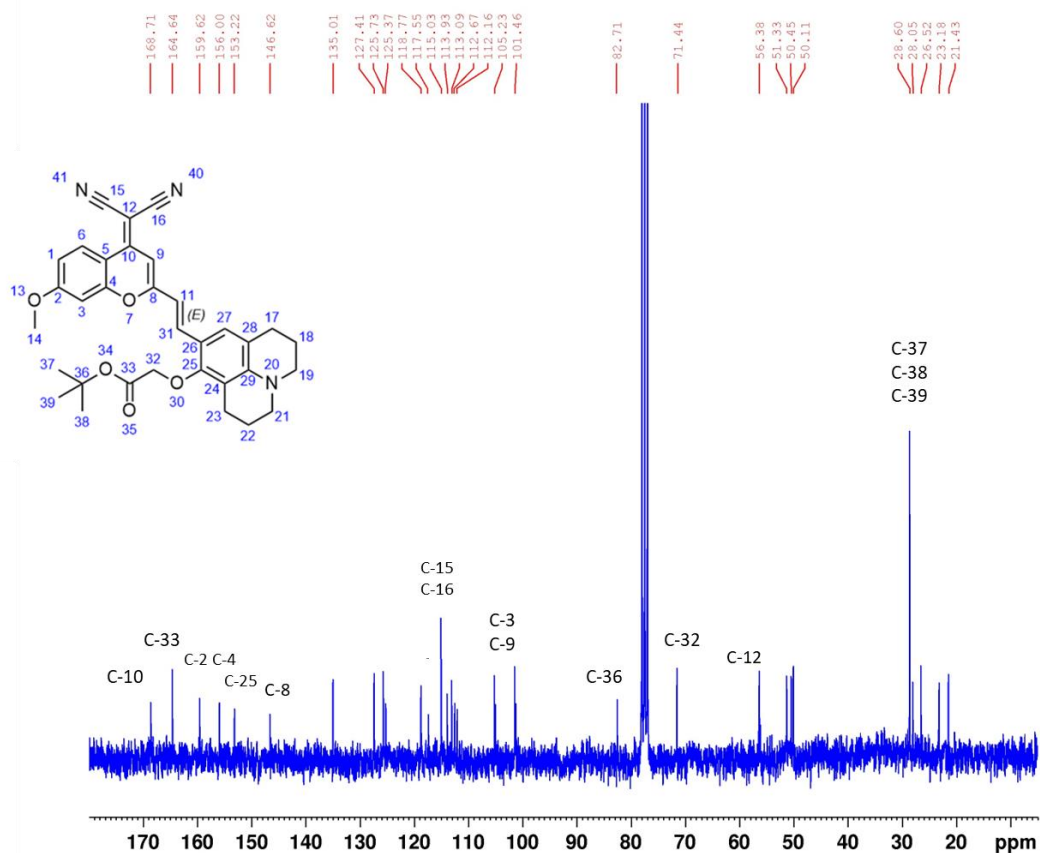


Εικόνα 63. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 11 σε διαλύτη  $\text{DMSO}-d_6$  (400 MHz, 25 °C).

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO):**  $\delta$  8.63 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H, H-6), 8.04 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H, H-31), 7.33 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H, H-1), 7.21 (s, 2H, H-3 και H-27), 7.02 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H, H-11), 6.72 (s, 1H, H-9), 4.37 (s, 2H, H-32), 3.95 (s, 3H, H-14), 3.25 (t,  $J = 5.8$  Hz, 4H, H-19 και H-21), 2.68 (t,  $J = 6.5$  Hz, 4H, H-17 και H-23), 1.89 – 1.82 (p,  $J = 6.3$  Hz, 4H, H-18 και H-22), 1.46 (s, 9H, H-37 και H-38 και H-39).

Παρατηρήσεις:

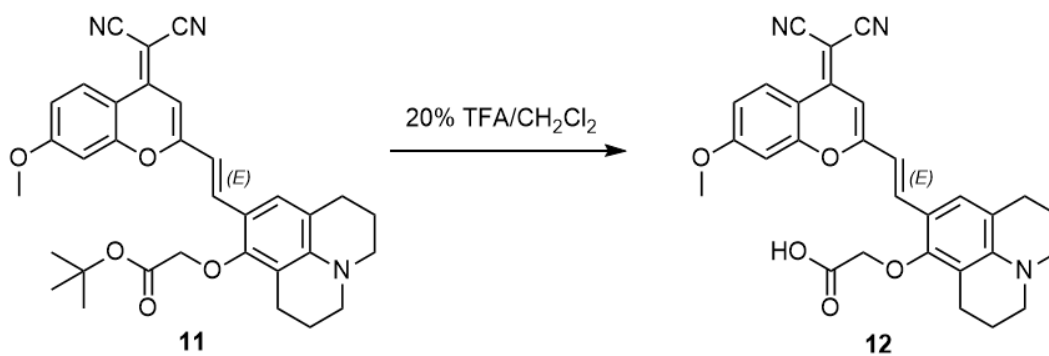
Παρατηρούμε ότι η σύνθεση της ένωσης 11 ήταν επιτυχής, καθώς στο φάσμα NMR υφίστανται οι κορυφές στα 8,04 και 7,02 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια του διπλού δεσμού, που προκύπτει μετά την συμπύκνωση. Επιπλέον, βάσει της τιμής σύζευξης spin-spin των πρωτονίων αυτών ( $J=15,8$  Hz) συμπεραίνουμε ότι ο διπλός δεσμός υιοθετεί διαμόρφωση (E).



Εικόνα 64. Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 11 σε διαλύτη  $\text{CDCl}_3$  (101 MHz, 25 °C).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  168.71 (C-10), 164.64 (C-33), 159.62 (C-2), 156.00 (C-4), 153.22 (C-25), 146.62 (C-8), 135.01 (C-29), 127.41, 125.73, 125.37, 118.77, 117.55, 115.03 (C-15 και C-16), 113.94, 113.10, 105.23, 101.46, 82.71 (C-36), 71.44 (C-32), 56.38 (C-12), 51.33, 50.44, 50.11, 28.60 (C-37, C-38 και C-39), 28.05, 26.52, 23.18, 21.43.

Σύνθεση της ένωσης 12 (κωδικό όνομα TA-38)



Εικόνα 65. Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 12 (TA-38).

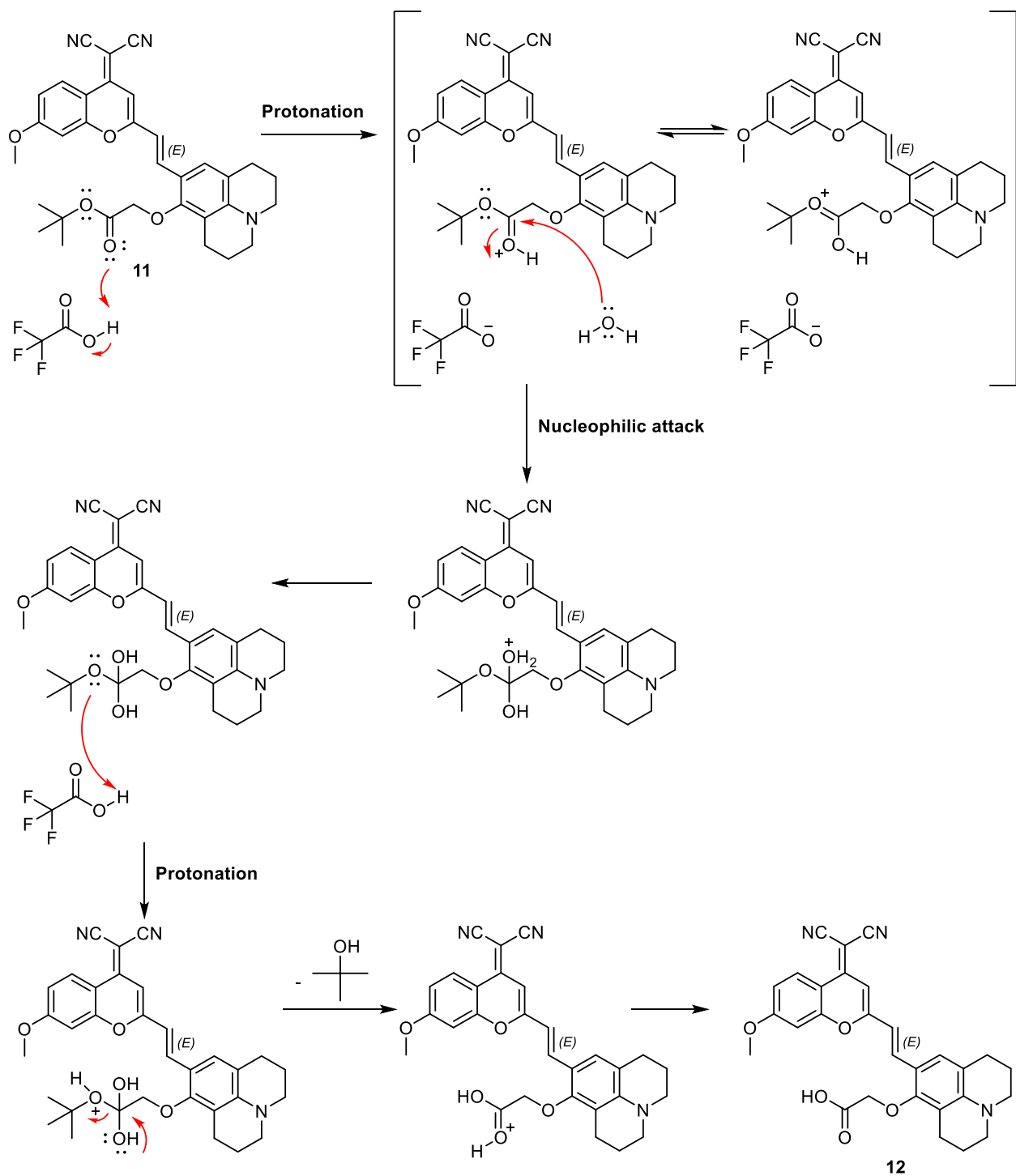
### Πειραματική πορεία

Σε σφαιρική φιάλη των 50 ml, που βρίσκεται τοποθετημένη σε πάγο (0 °C), έγινε προσθήκη της ένωσης 11 (300 mg, 0,5438 mmol) και διχλωρομεθανίου (16 ml). Ακολούθησε στάγδην προσθήκη με σταγονομετρικό χωνί του τρίφθορο-οξικού οξέος (4ml). Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 3 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών ανάπτυξης 5% v/v μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο. Μετά το πέρας της αντίδρασης, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό υψηλό κενό και το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε με χρωματογραφία στήλης (Silica gel) σε σύστημα διαλυτών έκλουσης μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο (έκλυση του μωβ-μαύρου στερεού σε ποσοστό 4,5% μεθανόλης σε διχλωρομεθάνιο) με απόδοση 94% (253 mg).

### Πιθανός μηχανισμός της εν λόγω αντίδρασης

Η αντίδραση αυτή περιλαμβάνει την απομάκρυνση της τριτ-βουτυλο-ομάδας, δηλαδή του τριτοταγούς καρβοκατιόντος της ισοπροπυλο-ομάδας, παρουσία ενός ισχυρού οξέος.

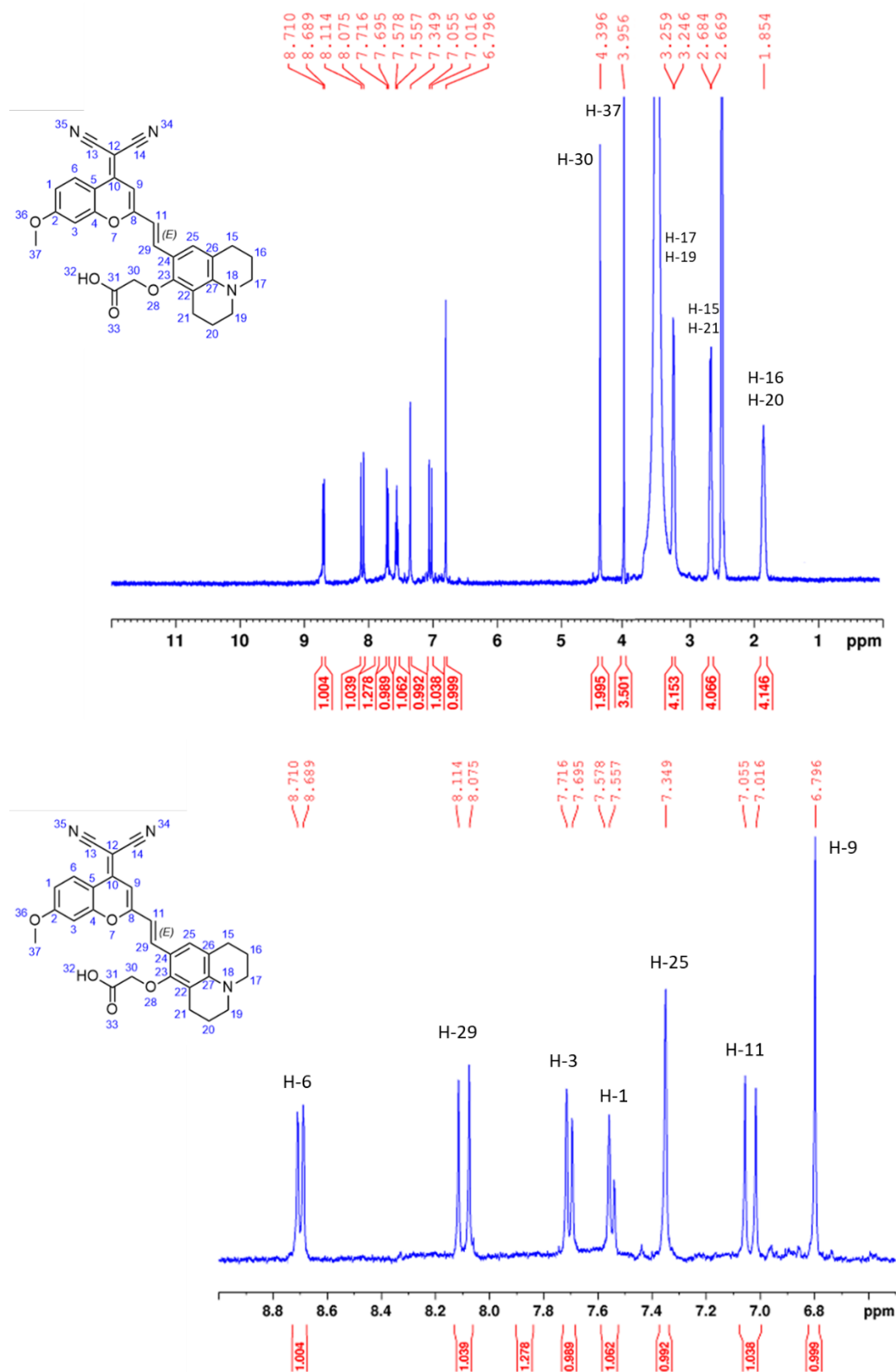
Εάν η αντίδραση γινόταν υπό πλήρως άνυδρες συνθήκες ο μηχανισμός θα περιλάμβανε αρχικά την πρωτονίωση του καρβονυλικού άνθρακα και έπειτα την απομάκρυνση του σχετικά σταθερού τριτοταγούς καρβοκατιόντος, ώστε να προέκυπτε το καρβοξυλικό οξύ. Παρόλα αυτά στο αντιδρών μίγμα υπάρχουν ίχνη υγρασίας, οπότε η αντίδραση μπορεί να αποκτήσει τον χαρακτήρα μιας υδρόλυσης του υπάρχοντος εστερικού δεσμού.



**Εικόνα 66.** Αναπαράσταση του προτεινόμενου μηχανισμού απομάκρυνσης της προστατευτικής ομάδας για να προκύψει η ένωση 12 (TA-38).

Ταυτοποίηση της ένωσης 12 (TA-38)

Ακολουθεί η ταυτοποίηση της ένωσης 12 με φασματοσκοπία NMR  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ .

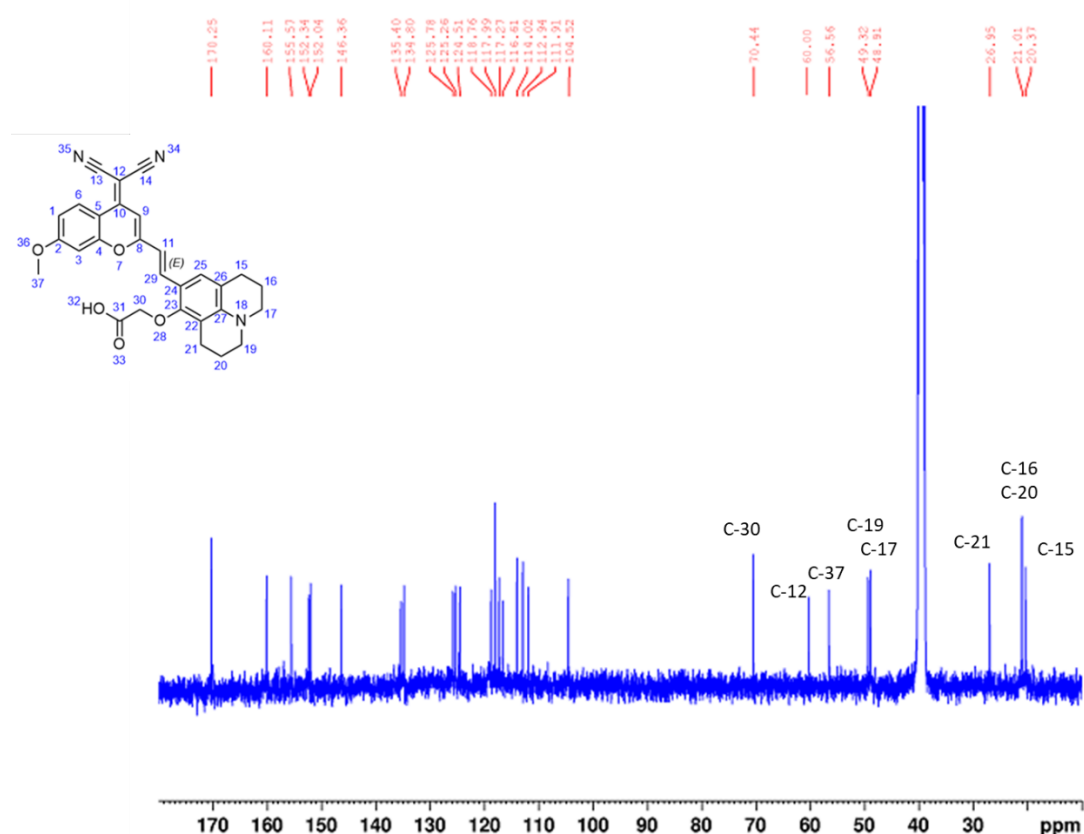


Εικόνα 67. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 12 και μεγέθυνση στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων σε διαλύτη  $\text{DMSO}-d_6$  (400 MHz, 25 °C).

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO):**  $\delta$  8.70 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H-6), 8.09 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H, H-29), 7.70 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, H-3), 7.56 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H-1), 7.35 (s, 1H, H-25), 7.04 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H, H-11), 6.80 (s, 1H, H-9), 4.40 (s, 2H, H-30), 3.96 (s, 3H, H-37), 3.25 (t,  $J = 5.7$  Hz, 4H, H-17 και H-19), 2.68 (t,  $J = 6.1$  Hz, 4H, H-15 και H-21), 1.85 (p,  $J = 6.4$  Hz, 4H, H-16 και H-20).

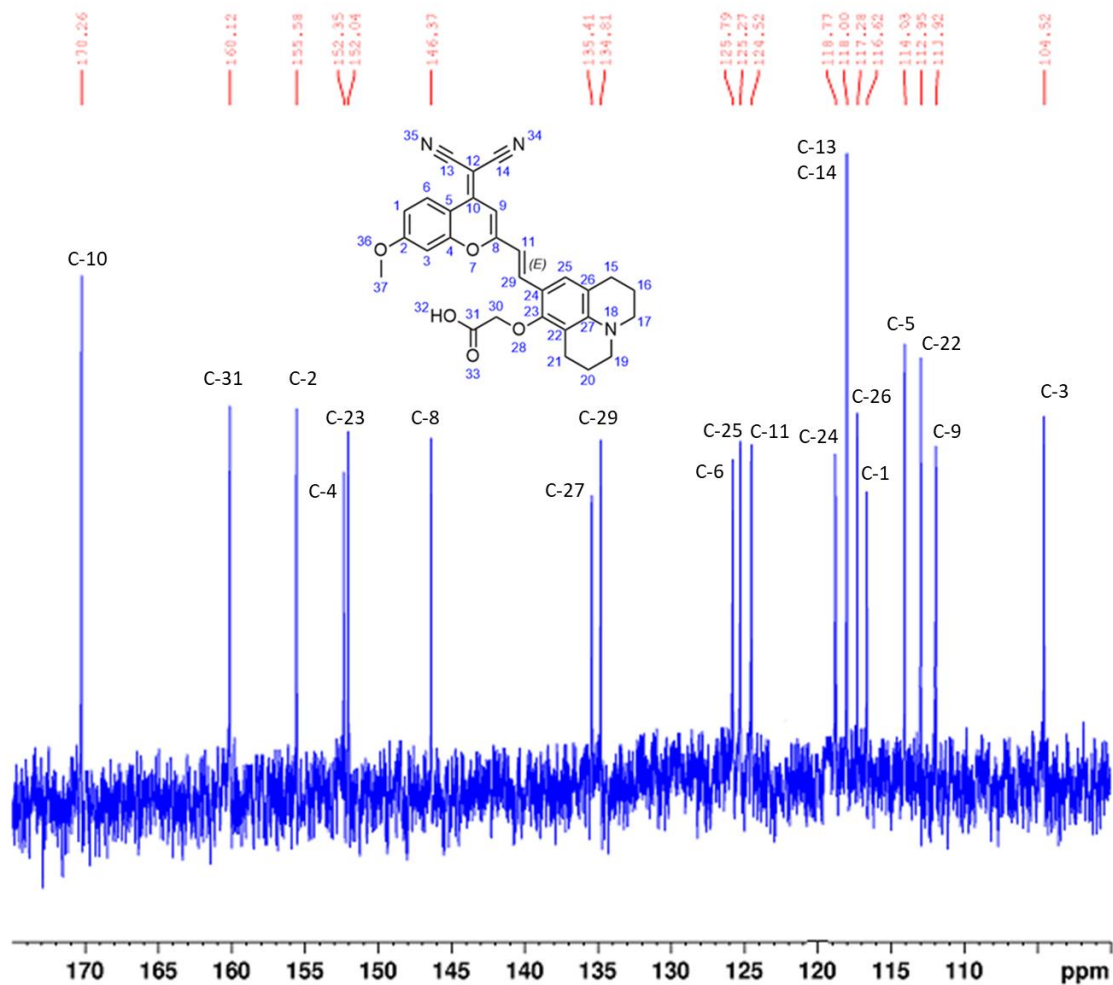
Παρατηρήσεις:

Το πρωτόνιο OH-32 της καρβοξυλικής ομάδας είναι εύκολα ανταλλάξιμο με D και για αυτόν τον λόγο δεν διαφαίνεται στο πρωτονιακό φάσμα. Παρόλα αυτά παρατηρούμε πως η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί, καθώς υπάρχει απουσία κορυφής κοντά στα 1,5-2,0 ppm με ολοκλήρωση 9 H, η οποία θα αντιστοιχούσε στα H της tert-βουτυλο-ομάδας, γεγονός που θα υποδείκνυε την αποτυχημένη απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας.



**Εικόνα 68.** Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 12 σε διαλύτη  $\text{DMSO}-d^6$  (101 MHz, 25 °C).





**Εικόνα 69.** Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 12 με μεγέθυνση στην περιοχή των αρωματικών ανθράκων σε διαλύτη  $\text{DMSO-}d^6$  (101 MHz, 25 °C).

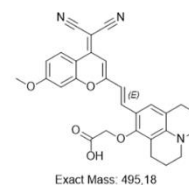
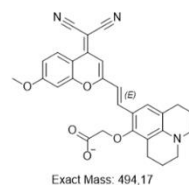
**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO):**  $\delta$  170.26 (C-10), 160.12 (C-31), 155.58 (C-2), 152.35 (C-4), 152.05 (C-23), 146.37 (C-8), 135.41 (C-27), 134.81 (C-29), 125.80 (C-6), 125.27 (C-25), 124.52 (C-11), 118.77 (C-24), 118.00 (C-14 και C-13), 117.28 (C-26), 116.62 (C-1), 114.03 (C-5), 112.95 (C-22), 111.92 (C-9), 104.53 (C-3), 70.45 (C-30), 60.00 (C-12), 56.57 (C-37), 49.33 (C-19), 48.92 (C-17), 26.95 (C-21), 21.02 (C-16 και C-20), 20.37 (C-15).

## Ταυτοποίηση με φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης

Item name: TA-38 [NEG] 3.5kV 0eV C.E.  
Item description: TA-38 [NEG] 3.5kV 0eV C.E.

Channel name: 1: Average Time 0.2958 min : TOF MS (50-1200) ESI- : Centroided : Combined

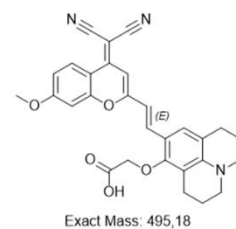
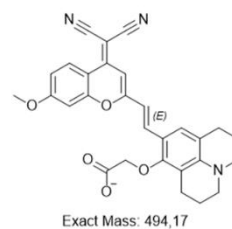
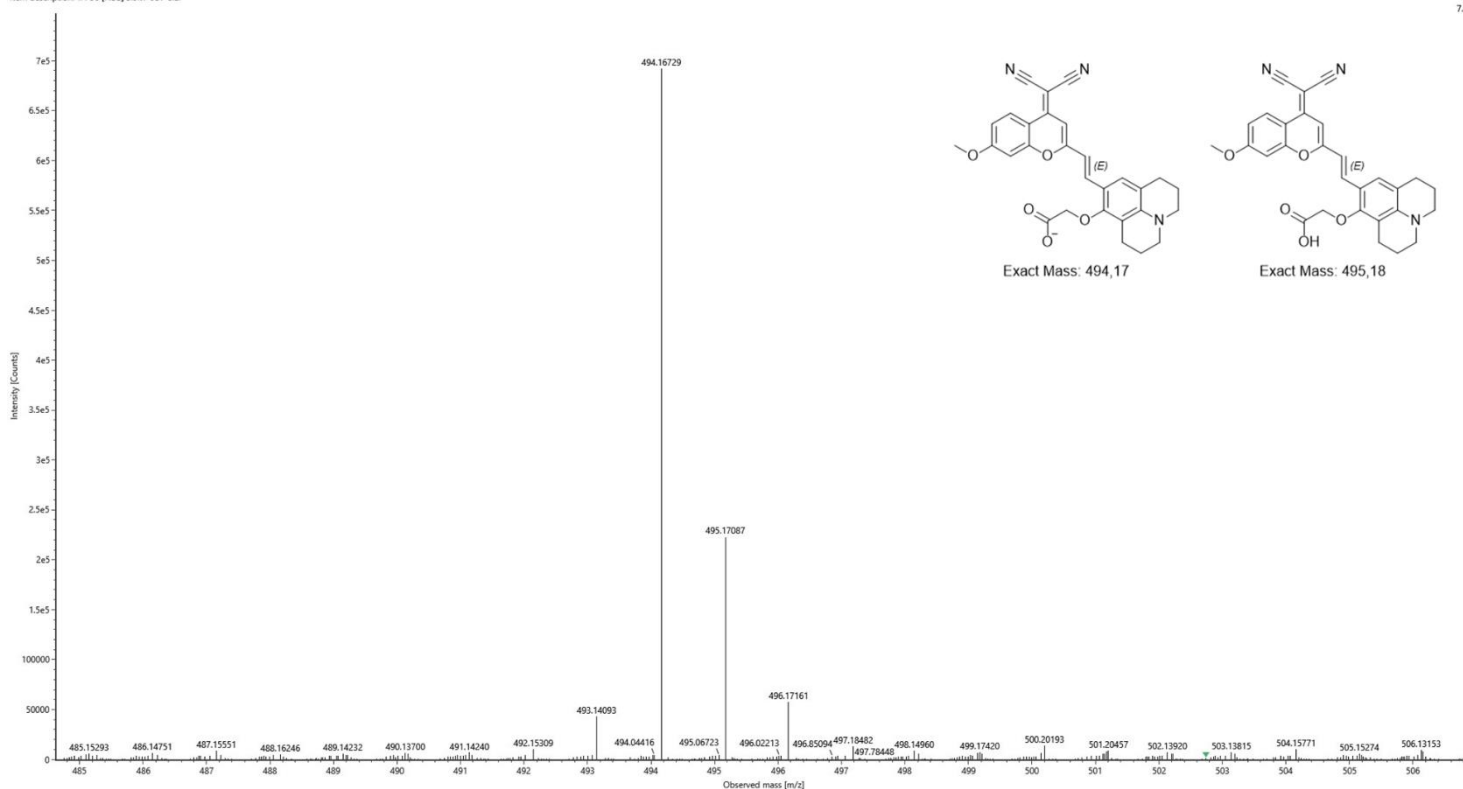
2.56e6



Item name: TA-38 [NEG] 3.5kV 0eV C.E.  
Item description: TA-38 [NEG] 3.5kV 0eV C.E.

Channel name: 1: Average Time 0.2958 min : TOF MS (50-1200) ESI- : Centroided : Combined

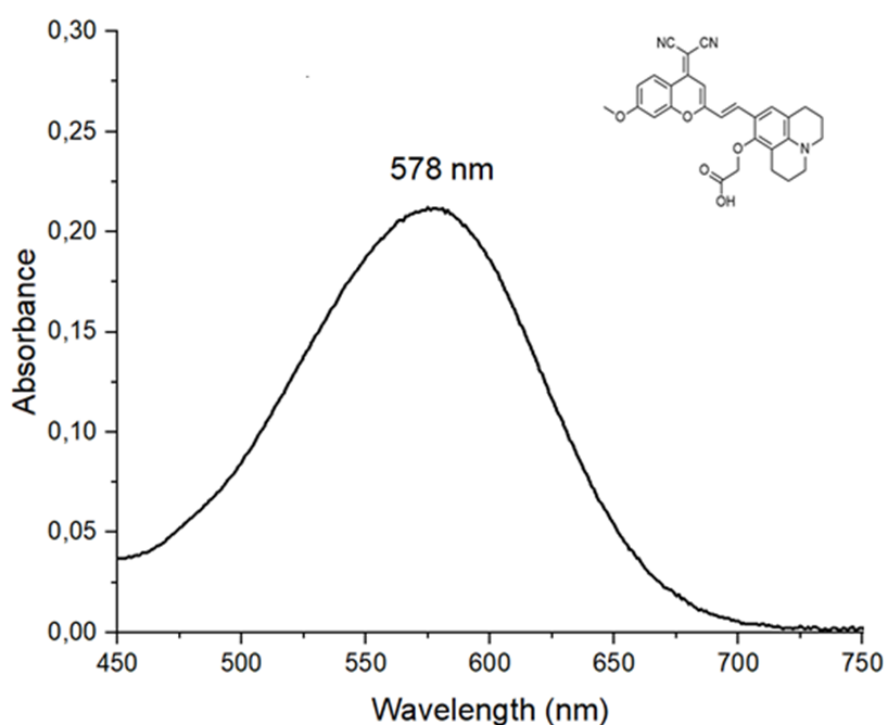
7.48e5



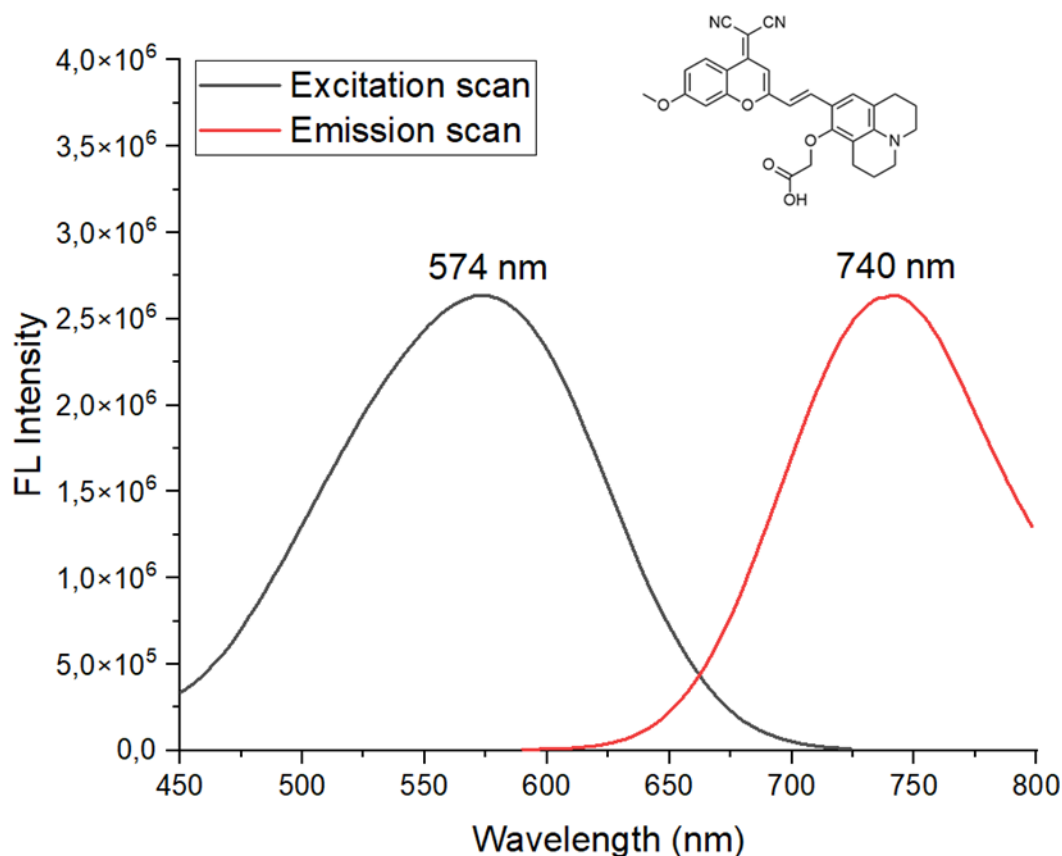
Εικόνα 70. Φάσμα μάζας υψηλής ανάλυσης της ένωσης 12. Η κορυφή  $m/z$  ίση με 494,17 αντιστοιχεί στο  $[M-H]^-$ .

### 3.1.3 Φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης **12** (TA-38)

Προκειμένου να αξιολογήσουμε τις φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης **12**, ως εν δυνάμει NIR χρωστική, πραγματοποιήθηκαν πειράματα, τόσο με φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους, όσο και φασματοσκοπία φθορισμού. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις απορρόφησης και φθορισμού της ένωσης **12** σε συνθήκες, στις οποίες η ένωση είναι πλήρως διαλυτή, και που σε έναν βαθμό προσομοιάζουν τις συνθήκες του πλάσματος στο αίμα (10 μM της ένωσης **12** σε 50:50 v/v DMSO/PBS (Phosphate-buffered saline), pH 7.40). Παρατηρήθηκε, πως η ένωση **12** εμφανίζει ένα διακριτό φάσμα απορρόφησης με τη μέγιστη τιμή απορρόφησης  $\lambda_{\max}$  να εντοπίζεται στα 578 nm. Επιπρόσθετα, η ένωση **12** διαθέτει ένα μήκος κύματος διέγερσης στα 574 nm και συγχρόνως εμφανίζει εκπομπή μέσω φθορισμού στα 740 nm. Από τις τιμές αυτές συμπεραίνουμε πως η ένωση **12** αποτελεί μία NIR χρωστική τύπου push-pull (ώθησης-έλξης ηλεκτρονιακής πυκνότητας), η οποία βασίζεται στο ICT φαινόμενο, και εμφανίζει μια μετατόπιση Stokes της τάξης των 166 nm.



**Εικόνα 71.** Φάσμα απορρόφησης της ένωσης **12** (συγκέντρωσης 10 μM) σε σύστημα 50:50 v/v DMSO:PBS, pH 7.4 και θερμοκρασία 37 °C.



**Εικόνα 72.** Φάσματα διέγερσης και φθορισμού της ένωσης **12** (συγκέντρωσης 10  $\mu\text{M}$ ) σε σύστημα 50:50 v/v DMSO:PBS, pH 7.4 και θερμοκρασία 37 °C και step 2, ExBw: 5, EmBw: 5.

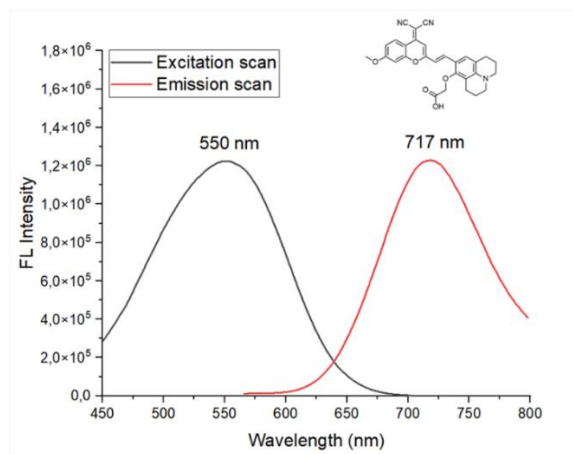
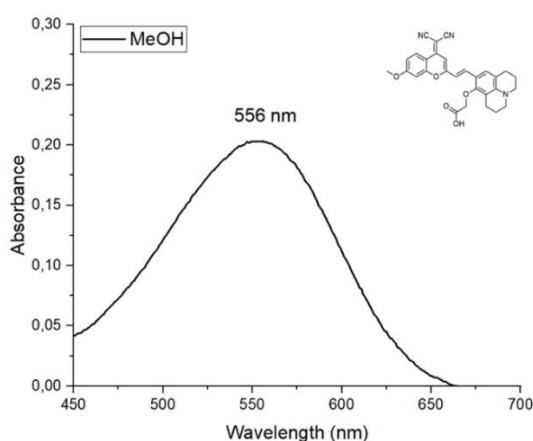
$\lambda_{\text{abs}}$	$\lambda_{\text{exc}}$	$\lambda_{\text{em}}$	Stokes shift
578 nm	574 nm	740 nm	166 nm

**Πίνακας 2.** Τα χαρακτηριστικά μήκη κύματος μέγιστης απορρόφησης, διέγερσης και εκπομπής για την ένωση **12**.

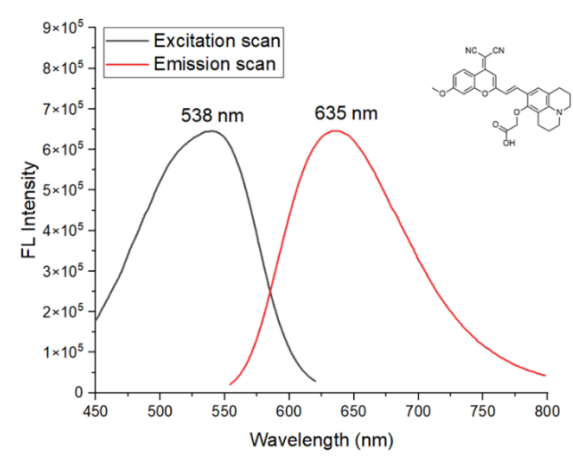
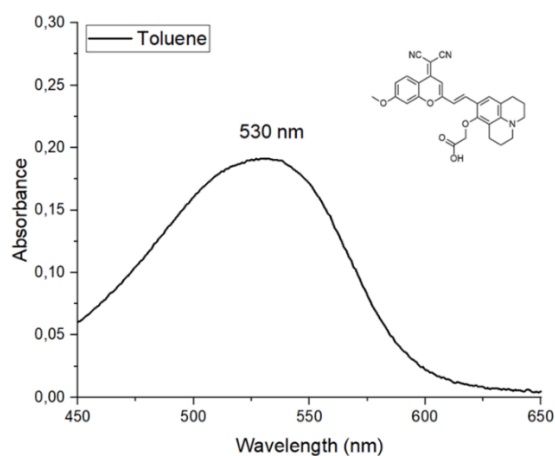
Η εν λόγω ένωση φέρει ομάδες δότη και δέκτη ηλεκτρονίων. Εξαιτίας αυτού, αφού γίνει απορρόφηση φωτός, το ηλεκτρικό φορτίο μεταφέρεται από τον δότη στον δέκτη, μέσω του συζυγιακού συστήματος. Έτσι, προκύπτει μια διεγερμένη κατάσταση, η οποία χαρακτηρίζεται από την δημιουργία διπόλων. Κατά την διαδικασία της αποδιέγερσης, γίνεται αλληλεπίδραση αυτών με δίπολα του διαλύτη (επαναδιάταξη διπολικών ροπών, δονητική χαλάρωση). Από αυτό συμπεραίνουμε πως, σε ένα πολικό μέσο, τα διεγερμένα μόρια χρησιμοποιούν ένα μέρος της απορροφούμενης ενέργειας για την επαναδιάταξη της διπολικής ροπής των μορίων του διαλύτη. Εν αντιθέσει, σε ένα άπολο μέσο, τα διεγερμένα μόρια χρησιμοποιούν ενέργεια, ώστε να προκαλέσουν την πόλωση των μορίων του διαλύτη. Η πρώτη διαδικασία απαιτεί μεγαλύτερα ποσά ενέργειας σε σχέση με τη δεύτερη, γεγονός που συνεπάγεται πως τα φάσματα εκπομπής σε πολικά μέσα μετατοπίζονται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος.

Επομένως, πραγματοποιήθηκαν πειράματα της ένωσης **12** 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). Συγκεκριμένα, εκτός

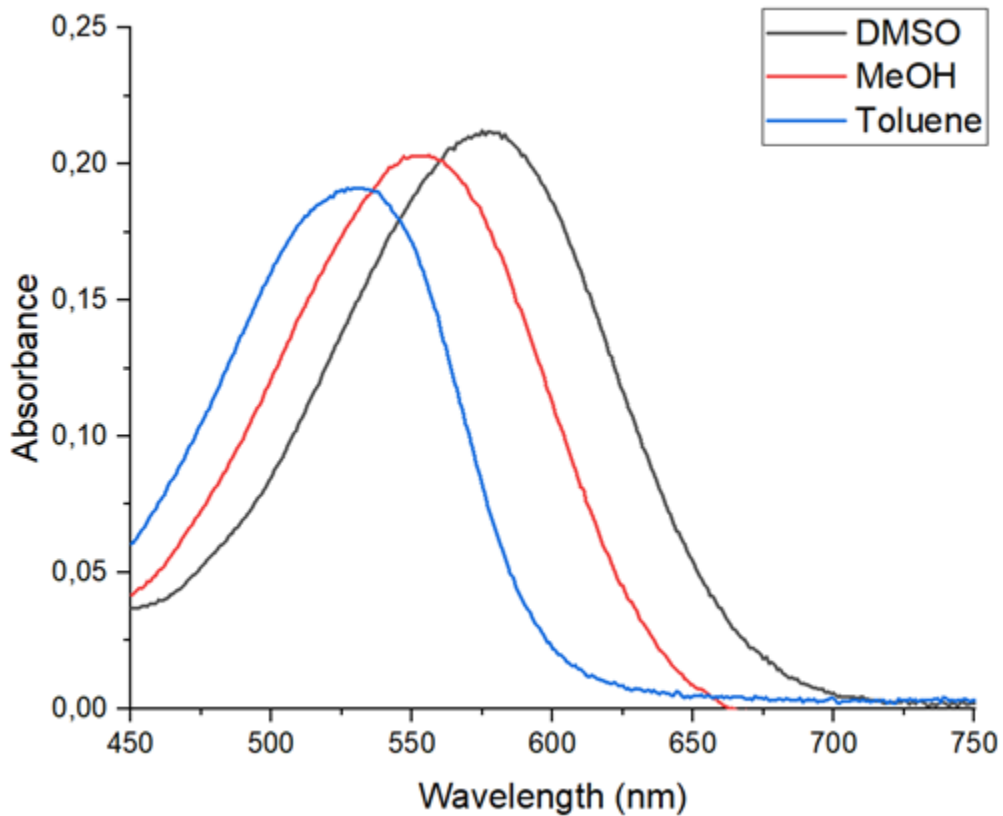
του διμεθυλοσουλφοξειδίου, το οποίο πρόκειται για έναν πολικό απρωτικό διαλύτη, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις απορρόφησης και φθορισμού σε μεθανόλη (πολικός πρωτικός διαλύτης) και σε τολουόλιο (μη πολικός διαλύτης). Αυτό που παρατηρήθηκε είναι πως σε πιο πολικούς διαλύτες (μεθανόλη και διμεθυλοσουλφοξείδιο) το φάσμα εκπομπής είναι μετατοπισμένο σε μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με τον μη πολικό (τολουόλιο). Η μεταβολή των φωτοφυσικών ιδιοτήτων σε αλλαγές της πολικότητας των μορίων του διαλύτη μπορεί να υποδηλώνει και την απόκριση σε συνθήκες ή περιβάλλοντα, που σχετίζονται με τον καρκίνο.



**Εικόνα 73.** Φάσμα απορρόφησης, διέγερσης και φθορισμού της ένωσης **12** (συγκέντρωσης 10  $\mu\text{M}$ ) σε διαλύτη μεθανόλη, σε θερμοκρασία 37  $^{\circ}\text{C}$  και *step 2*, *ExBw: 5, EmBw: 5*.



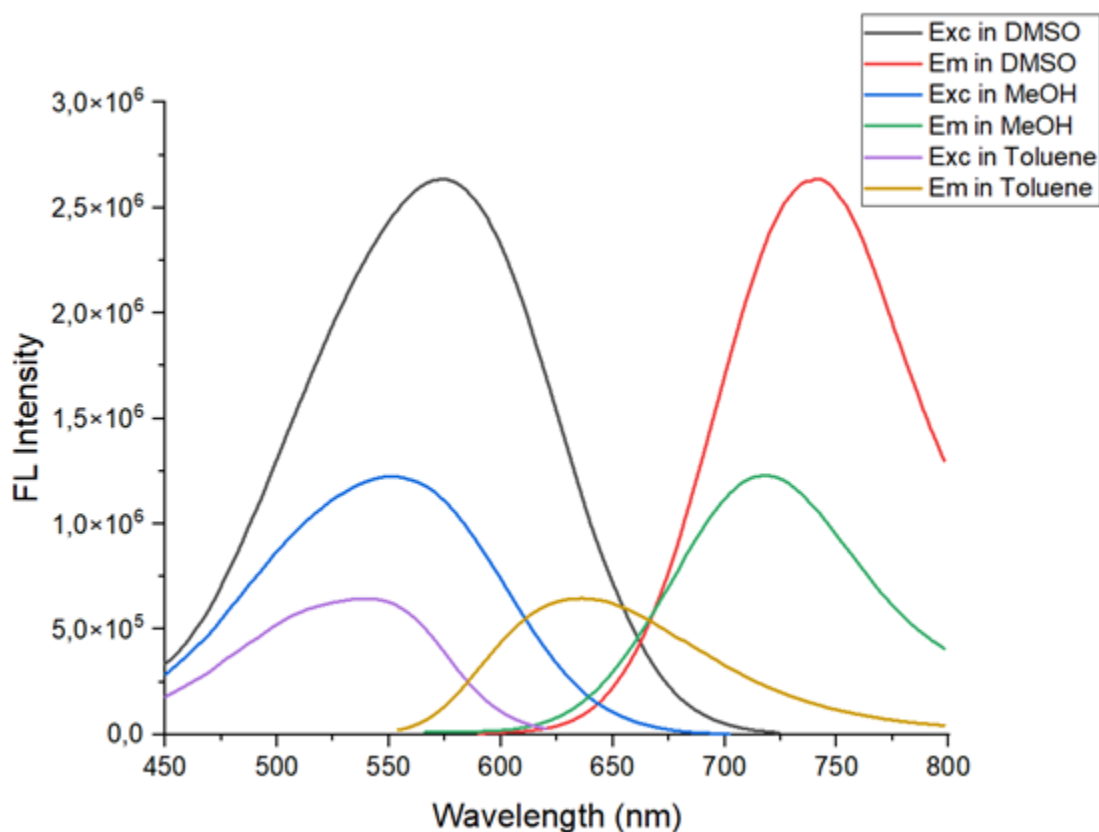
**Εικόνα 74.** Φάσμα απορρόφησης, διέγερσης και φθορισμού της ένωσης **12** (συγκέντρωσης 10  $\mu\text{M}$ ) σε διαλύτη τολουόλιο, σε θερμοκρασία 37  $^{\circ}\text{C}$  και *step 2*, *ExBw: 5, EmBw: 5*.



*Εικόνα 75. Συγκεντρωτικό φάσμα απορρόφησης της ένωσης **12** (συγκέντρωσης 10  $\mu\text{M}$ ) σε μη πολικό διαλύτη, σε πολικό απρωτικό διαλύτη και σε πολικό πρωτικό διαλύτη, σε θερμοκρασία 37 °C.*

Παρατήρηση:

Αξίζει να σημειωθεί πως εκτός από μετατόπιση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος εκπομπής, σε πιο πολικούς διαλύτες παρατηρούνται και υψηλότερες τιμές στην ένταση του φθορισμού, όπως διαφαίνεται ξεκάθαρα και στην παρακάτω **Εικόνα 76**.



**Εικόνα 76.** Συγκεντρωτικό φάσμα φθορισμού της ένωσης **12** (συγκέντρωσης 10  $\mu$ M) σε μη πολικό διαλύτη, σε πολικό απρωτικό διαλύτη και σε πολικό πρωτικό διαλύτη, σε θερμοκρασία 37 °C.

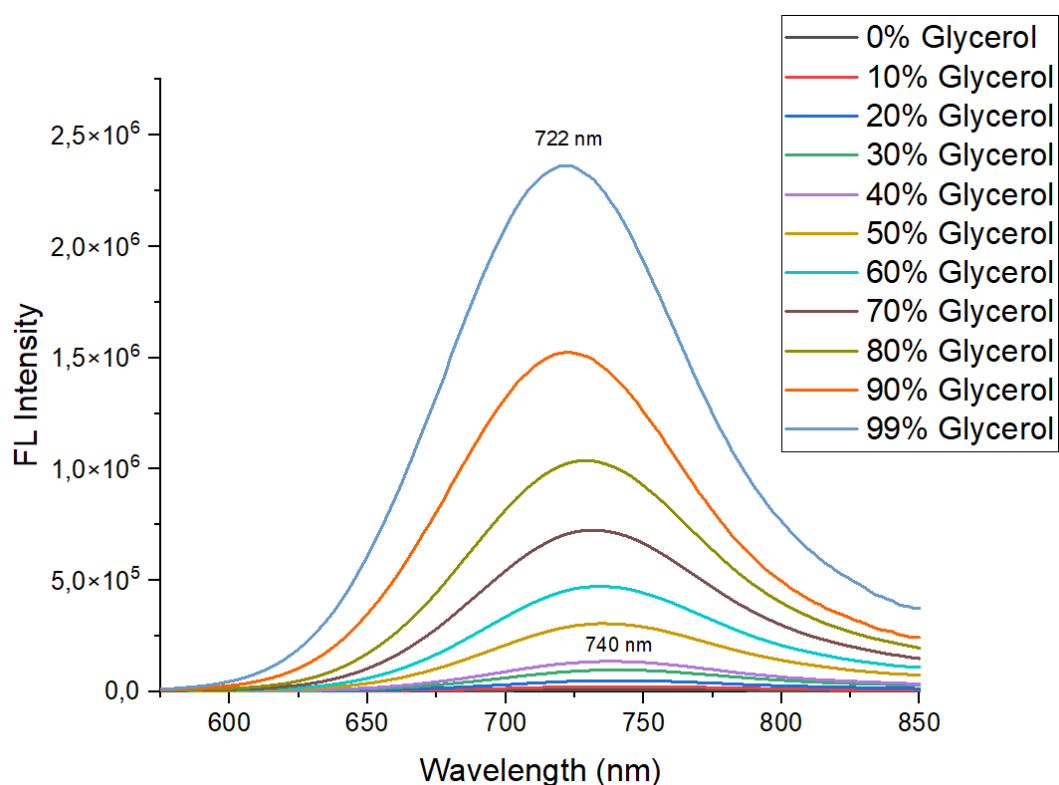
Διαλύτης	$\lambda_{abs}$ (nm)	$\lambda_{exc}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)
Διμεθυλοσουλφοξείδιο	578	574	740
Μεθανόλη	556	550	717
Τολουόλιο	530	538	635

**Πίνακας 3.** Τα χαρακτηριστικά μήκη κύματος μέγιστης απορρόφησης, διέγερσης και εκπομπής για την ένωση **12** σε διαφορετικούς, ως προς την πολικότητα, διαλύτες.

### 3.1.3.1 Έλεγχος απόκρισης της ένωσης 12 σε μεταβολές του ιξώδους

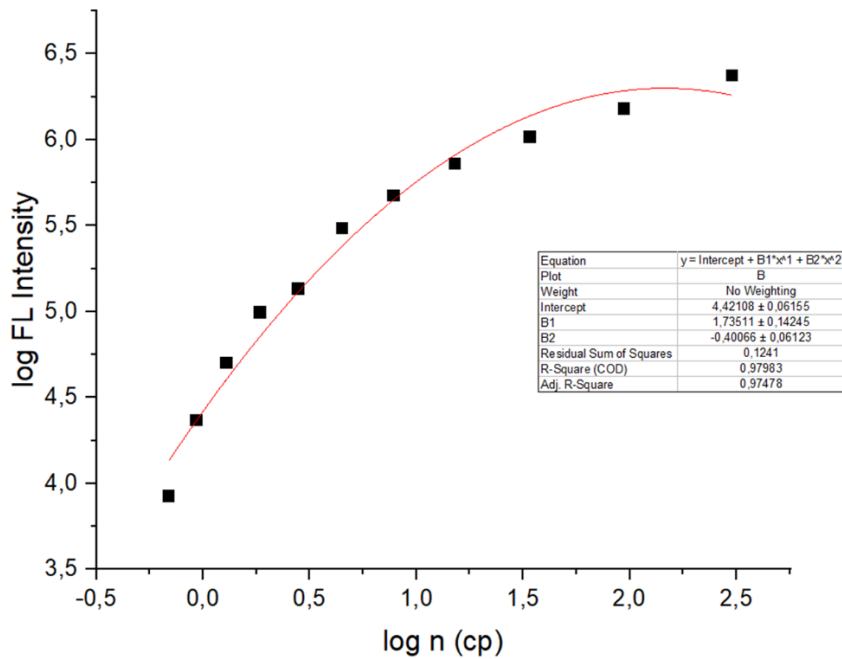
Όπως έχει προαναφερθεί, το ιξώδες αποτελεί μια φυσική σημαντική παράμετρος, που εμφανίζεται διαταραγμένη στα καρκινικά κύτταρα. Για παράδειγμα, στα αιμοφόρα αγγεία των φυσιολογικών ιστών οι τιμές ιξώδους κυμαίνονται στα 4-6 centipoise ( $1 \text{ cP} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ ), ενώ σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος, οι τιμές αυτές είναι πάνω από 40 cP. Έτσι, φθορίζουσες ενώσεις, που δύνανται να μεταβάλλουν τις φωτοφυσικές του ιδιότητες σε περιβάλλοντα με διαφορετικό ιξώδες, μπορεί να αποτελέσουν σημαντικά διαγνωστικά εργαλεία για μια παθολόγιο κατάσταση, όπως ο καρκίνος. Για να αξιολογήσουμε την απόκριση της ένωσης **12** στη μεταβολή του ιξώδους, πραγματοποιήθηκαν πειράματα, τόσο μέσω φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους, όσο και φασματοσκοπίας φθορισμού χρησιμοποιώντας διαφορετικά δυαδικά μίγματα γλυκερόλης/ νερού (από 0% έως 99%), σε

θερμοκρασία 37 °C. Όπως απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα, η ένωση **12** σε υδατικό μέσο (σχεδόν μηδενικού ιξώδους) εμφανίζει ένα ασθενές σήμα φθορισμού. Με σταδιακή αύξηση του ποσοστού γλυκερόλης, παρατηρήθηκε ότι η ένταση του φθορισμού, από 0% γλυκερόλη (0,6932 cp, log n = -0,15914) στο 99% γλυκερόλη (301,56 cp, log n = 2,479374), αυξήθηκε σημαντικά μέχρι και **308 φορές** στα 722 nm. Επίσης, παρατηρήθηκε μια μετατόπιση της μέγιστης τιμής έντασης φθορισμού από τα 740 nm, στο διάλυμα 0% γλυκερόλης, στα 722 nm, στο διάλυμα 99% γλυκερόλης. Αυτή η αύξηση μπορεί να οφείλεται σε περιορισμό της περιστροφής ορισμένων δεσμών του μορίου σε αυξημένες τιμές ιξώδους.



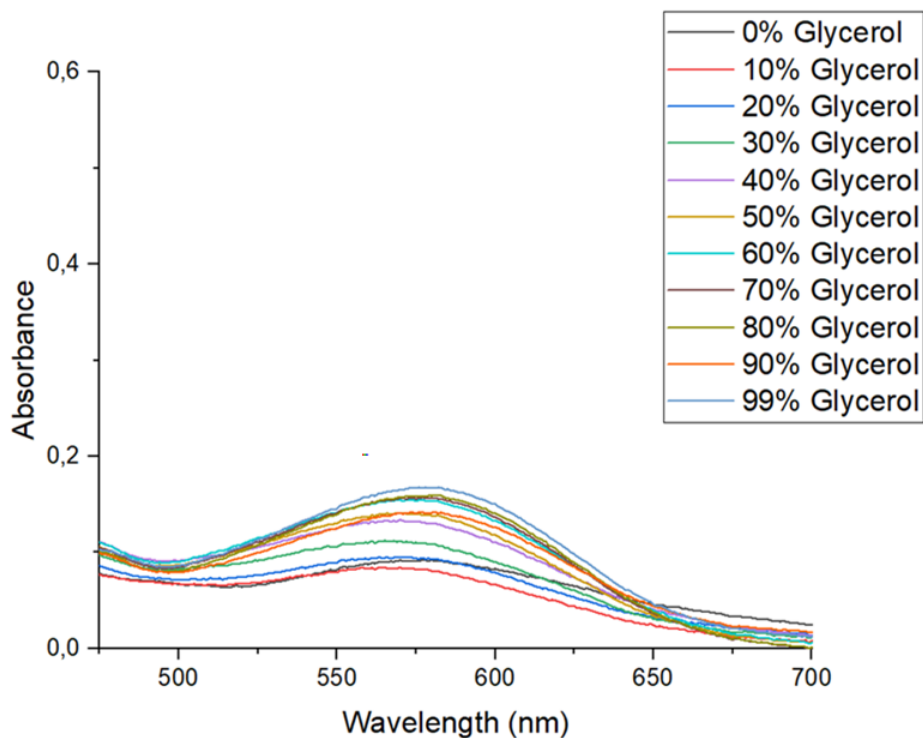
**Εικόνα 77.** Φάσματα φθορισμού της ένωσης **12** (συγκέντρωσης 10 μM) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης-νερού (από 0% έως 99% γλυκερόλη) σε θερμοκρασία 37 °C κατόπιν διέγερσης στα 574 nm. (step 2, ExBw: 5, EmBw: 5).





**Εικόνα 78.** Γραφική παράσταση της συσχέτισης του λογαρίθμου της έντασης φθορισμού με τον λογάριθμο του ιξώδους ( $\eta$ ) σε συστήματα γλυκερόλης-νερού, κατόπιν διέγερσης στα 574 nm σε θερμοκρασία 37°C. Η εξίσωση που συνδέει αυτά τα δύο μεγέθη δεν είναι γραμμική, καθώς με αύξηση του ιξώδους έχουμε αύξηση της έντασης φθορισμού, αλλά συγχρόνως και μετατόπιση στο μήκος κύματος μέγιστης έντασης φθορισμού.

Αξίζει να σημειωθεί πως πραγματοποιήθηκαν και πειράματα φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους, προκειμένου να διαπιστωθεί πως αυτή η απόκριση στο ιξώδες δεν οφείλεται σε καλύτερη διαλυτότητα της ένωσης όσο αυξάνεται το ποσοστό γλυκερόλης.

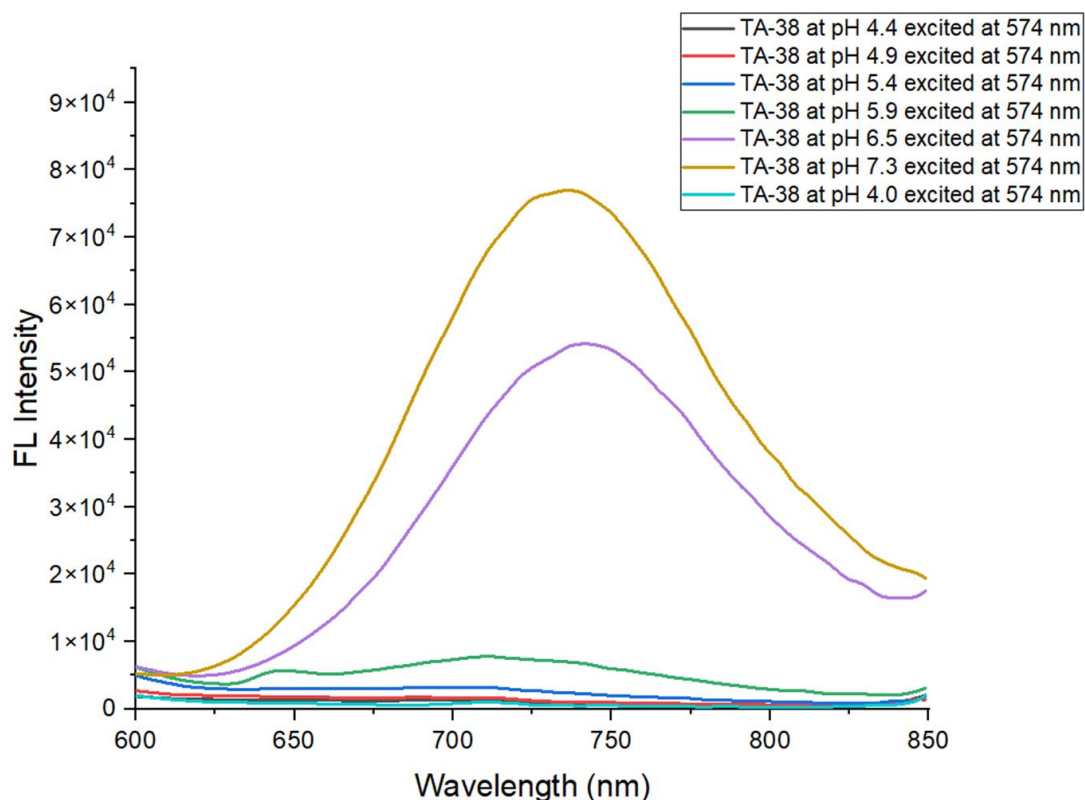


**Εικόνα 79.** Φάσματα απορρόφησης της ένωσης της ένωσης **12** (συγκέντρωσης 10  $\mu\text{M}$ ) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης-νερού σε θερμοκρασία 37°C (από 0% έως 99% γλυκερόλη).

**Συμπέρασμα:** Η ένωση 12 ανταποκρίνεται σε μεταβολές του ιζώδους και αυξάνει την ένταση του φθορισμού της έως και 300 φορές σε τιμές ιζώδους 300 centipoise. Τα φυσιολογικά κύτταρα εμφανίζουν τιμές ιζώδους μέχρι και 3-4 centipoise, ενώ στα περισσότερα καρκινικά οι τιμές φτάνουν μέχρι και 300-400 centipoise. Συνεπώς, αν η ένωση αυτή εισέλθει στα καρκινικά κύτταρα θα παρουσιάσει μια έντονη ενίσχυση του φθορισμού της.

### 3.1.3.2 Έλεγχος απόκρισης της ένωσης 12 σε μεταβολές του pH

Όπως ήδη προαναφέρθηκε, το pH αποτελεί μία παράμετρος, η οποία είναι διαταραγμένη στα καρκινικά κύτταρα. Ενώ στα φυσιολογικά κύτταρα οι τιμές pH κυμαίνονται στα 7.2-7.4, στα καρκινικά αυτές είναι πιο χαμηλές (6.5-7.0). Για παράδειγμα, τα λυσοσώματα των υγιών κυττάρων έχουν τιμές pH 4.5-5.0, ενώ στα καρκινικά κύτταρα οι τιμές αυτές φθάνουν μέχρι και στο 4.0. [86] Για αυτόν τον λόγο, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε διαφορετικές τιμές pH, για να μελετήσουμε την συμπεριφορά της ένωσης, καθώς μεταβαίνει από pH 7.4, στο πλάσμα του αίματος, σε pH 6.0-6.5, που χαρακτηρίζει το εξωκυττάριο περιβάλλον των καρκινικών κυττάρων, ακόμα και σε pH 4.0. Προετοιμάστηκαν διάφορα διαλύματα κιτρικών αλάτων διαφορετικού pH (από πρότυπα διαλύματα: α) 0,1 M κιτρικού οξέος, β) 0,1 M κιτρικού νατρίου). [88]



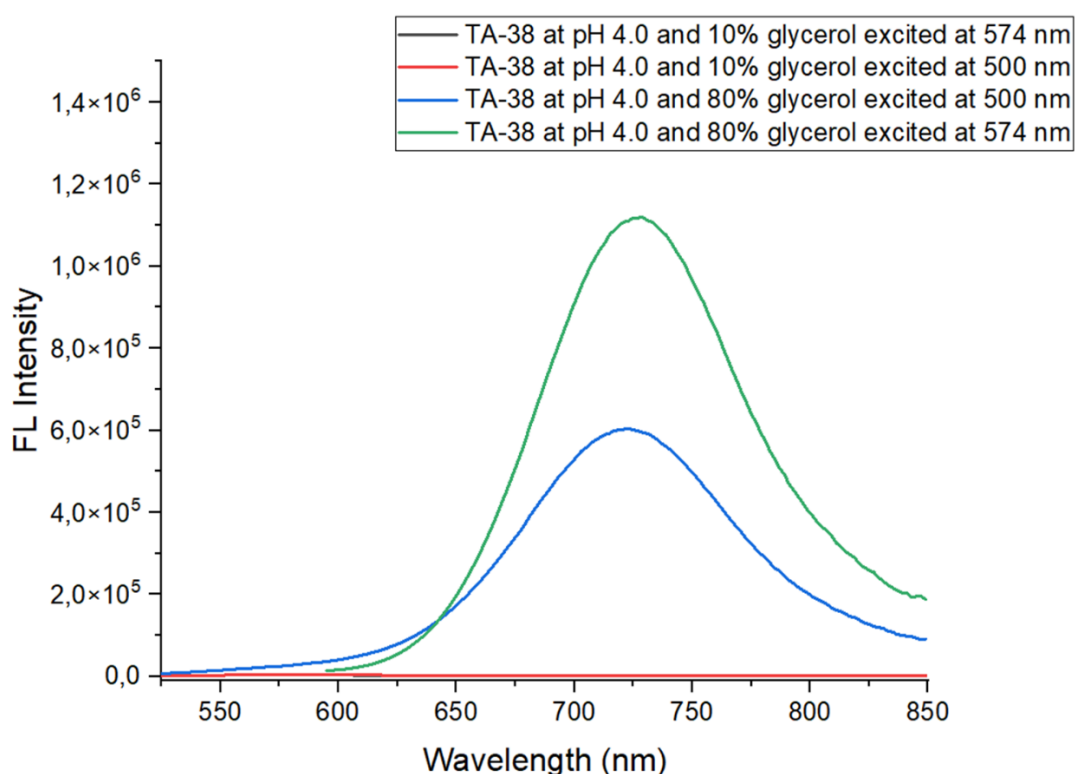
**Εικόνα 80.** Φάσματα φθορισμού της ένωσης 12 σε ρυθμιστικά διαλύματα 10:90 v/v DMSO/Buffer διαφορετικών τιμών pH, σε θερμοκρασία 37°C, μετά από διέγερση στα 574 nm (step 2, ExBw: 5, EmBw: 5).

Όπως μπορούμε να διακρίνουμε από την **Εικόνα 80**, η ένωση **12** σε χαμηλές τιμές pH (κάτω από 6.0) χάνει τον φθορισμό της, καθώς το φαινόμενο ICT περιορίζεται, λόγω μιας πιθανούς πρωτονίωσης του τριτοταγούς αζώτου, το οποίο αποτελεί και τον κύριο δότη ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Αντίθετα για τιμές pH άνω του 6.5 δεν επέρχεται πρωτονίωση του αζώτου και έτσι δεν αποκόπτεται το ICT φαινόμενο. Επομένως, όταν μεταβαίνουμε σε αλκαλικό pH παρατηρούμε μια αύξηση της έντασης φθορισμού έως και **148 φορές** στα **737 nm**.

**Συμπέρασμα:** Η ένωση 12 ανταποκρίνεται σε μεταβολές του pH και συγκεκριμένα θα χάσει αρκετά τον φθορισμό της όταν βρεθεί στο περιβάλλον των καρκινικών κυττάρων, ή ακόμα αν βρεθεί και στα λυσοσώματα υγιών κυττάρων, λόγω πρωτονίωσης της τριτοταγούς αμίνης. Επιπλέον, εξαιτίας αυτής της πρωτονίωσης η ένωση πιθανόν θα παγιδευτεί στα λυσοσώματα των κυττάρων, επιβεβαιώνοντας τον αρχικό ισχυρισμό που είχαμε κάνει κατά τον σχεδιασμό της εν λόγω ένωσης.

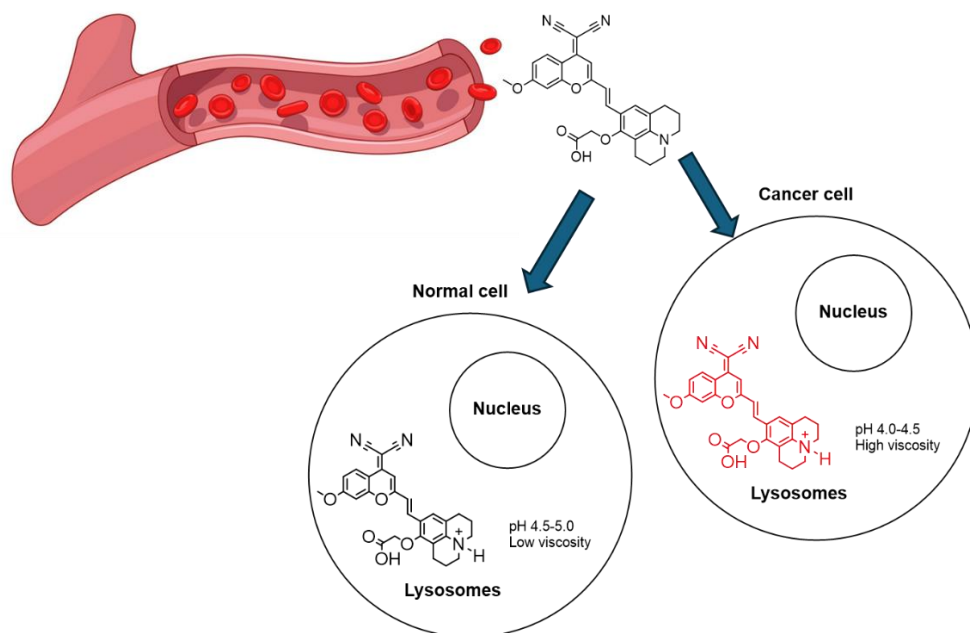
### 3.1.3.3 Έλεγχος των φωτοφυσικών ιδιοτήτων της ένωσης 12 σε συνθήκες που προσομοιάζουν τόσο τα λυσοσώματα των υγιών όσο και των καρκινικών κυττάρων

Εφόσον η ένωση **12** ανταποκρίνεται και σε μεταβολές του ιζώδους και σε μεταβολές του pH, θελήσαμε να εξακριβώσουμε τον τρόπο με τον οποίο, η ένωση ανταποκρίνεται σε σύστημα χαμηλού ιζώδους και χαμηλού pH (συνθήκες λυσοσωμάτων υγιών κυττάρων) και σε σύστημα υψηλού ιζώδους και χαμηλού pH (μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων). Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού συνοψίζονται στην **Εικόνα 81**.



**Εικόνα 81.** Φάσματα φθορισμού της ένωσης 12 (συγκέντρωσης 10  $\mu\text{M}$ ) σε διαλύματα με pH ίσο με 4.0, ώστε να είναι πρωτονιωμένη η τριτοταγής αμίνη και με διαφορετικά ποσοστά γλυκερόλης (10% και 80%), σε θερμοκρασία 37°C, με διέγερση στα 500 και 574 nm (step 2, ExBw: 5, EmBw: 5).

**Συμπέρασμα:** Παρατηρούμε πως σε χαμηλό pH και σε χαμηλό ιξώδες, συνθήκες που αντιστοιχούν στα λυσοσώματα των υγιών κυττάρων, ο φθορισμός της ένωσης είναι αρκετά μικρός (της τάξης του  $10^3$ ), ενώ αντίθετα σε διαλύματα που ναι μεν το pH είναι χαμηλό, αλλά το ιξώδες είναι υψηλό, παρατηρείται αύξηση της έντασης φθορισμού έως και **510 φορές** στα 730 nm με διέγερση στα 574 nm.



**Εικόνα 82.** Πιθανός μηχανισμός δράσης της ένωσης **12** για ανίχνευση των καρκινικών κυττάρων.

### 3.1.4 Συμπεράσματα

Πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας ένωσης, η οποία φθορίζει μέσω του φαινομένου ICT, στην περιοχή του Εγγύς Υπερύθρου. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι ανταποκρίνεται σε μεταβολές του ιξώδους με αύξηση της έντασης φθορισμού έως και 300 φορές. Σχετικά με την επίδραση του pH, βρέθηκε ότι η ένωση πρωτονιώνεται και χάνει τον φθορισμό της σε τιμές pH κάτω του 6.5. Συνοψίζοντας, όπως απεικονίζεται και στην **Εικόνα 82**, όταν η ένωση βρεθεί στα λυσοσώματα ενός φυσιολογικού κυττάρου θα χάσει τον φθορισμό της, ενώ όταν βρεθεί σε καρκινικό κύτταρο θα φθορίσει έντονα, υποδεικνύοντας την παρουσία καρκινικών κυττάρων.

## 3.2 Σύνθεση μιας εν δυνάμει θεραπογνωστικής ένωσης, βασισμένη στην διαγνωστική ένωση 12, με ενσωμάτωση του κυτταροτοξικού παράγοντα, δοξορουβικίνη

### 3.2.1 Ορθολογικός σχεδιασμός

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί είναι τεράστια η ανάγκη ανάπτυξης θεραπογνωστικών μορίων για την ανίχνευση και καταπολέμηση των καρκινικών κυττάρων. Λαμβάνοντας υπόψη τις φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης 12, καθώς και την ενδεχόμενη δράση της ως διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση καρκινικών κυττάρων, θελήσαμε να αξιοποιήσουμε και την ελεύθερη καρβοξυλική ομάδα για την ενσωμάτωση ενός κυτταροτοξικού παράγοντα. Ουσιαστικά, προσπαθήσαμε να αναπτύξουμε ένα μόριο, το οποίο να διαθέτει έναν φθορίζων παράγοντα, μία ομάδα στόχευσης των λυσοσωμάτων (τριτοταγής αμίνη) και να ανταποκρίνεται στο καρκινικό μικροπεριβάλλον (μέσω του ιξώδους), αλλά ταυτόχρονα να φέρει έναν κυτταροτοξικό παράγοντα, ο οποίος να μπορεί να απελευθερωθεί στο περιβάλλον του όγκου, σκοτώνοντας εκλεκτικά τα εν λόγω κύτταρα. Ως αντικαρκινικό φάρμακο επιλέχθηκε η δοξορουβικίνη για δύο λόγους. Καταρχάς, είναι ένα γνωστό αντικαρκινικό φάρμακο ευρέως χρησιμοποιούμενο, το οποίο συνάμα διαθέτει τις κατάλληλες δραστικές ομάδες για να ενσωματωθεί στην καρβοξυλική ομάδα της ένωσης 12, μέσω ενός αμιδικού δεσμού.

Είδαμε και παραπάνω πως η δοξορουβικίνη οφείλει την τοξικότητά της στην παρεμβολή της στο DNA και στην αναστολή του ενζύμου τοποϊσομεράση II. Το πρόβλημά της έγκειται στο ότι δεν εμφανίζει εκλεκτικότητα έναντι των καρκινικών κυττάρων με αποτέλεσμα να είναι αρκετά τοξική και για τους υγιείς ιστούς. Μέχρι και σήμερα γίνονται αρκετές προσπάθειες σύνθεσης προφαρμάκων, τα οποία να φέρουν τη δοξορουβικίνη, αλλά να μην εμφανίζουν τοξικότητα, παρά μόνο όταν την απελευθερώσουν στοχευμένα στα καρκινικά κύτταρα. Αυτό επιτυγχάνεται με κατάλληλες τροποποιήσεις στη δομή της, έτσι ώστε να περιορίζεται η τοξικότητα όταν αυτή βρίσκεται συζευγμένη. Στη συγκεκριμένη περίπτωση εμείς επιλέξαμε να γίνει η σύζευξη με την ένωση 12, στην αμινομάδα του σακχάρου της δοξορουβικίνης. Έχει βρεθεί πως η συγκεκριμένη ομάδα συμμετέχει σε αρκετούς δεσμούς υδρογόνου με τις αζωτούχες βάσεις του DNA (συγκεκριμένα με τις αζωτούχες βάσεις αδενίνη και κυτοσίνη, A-7, C-5 και C-19), γεγονός που σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση δοξορουβικίνης-DNA. Εξαιτίας αυτής της παρεμβολής παρατηρείται δομική αλλοίωση του DNA, το οποίο αλλάζει διαμόρφωση. Τέτοιες αλλαγές στη διαμόρφωση δεν έχουν παρατηρηθεί όταν η αμινο-ομάδα του φαρμάκου είναι δεσμευμένη. Οπότε υποθέσαμε πως η δέσμευση αυτή θα είχε ως επακόλουθο τη μείωση της τοξικότητας του συζεύγματος χρωστικής-φαρμάκου. [89][90][91]

Επιπλέον, επιλέχθηκε να γίνει αυτού του είδους η σύζευξη, καθώς ο αμιδικός δεσμός ανήκει στην κατηγορία χημικών δεσμών, που συναντώνται ευρέως σε πολλά βιοδραστικά μόρια και ταυτόχρονα διαθέτει υψηλή σταθερότητα κάτω από διάφορες συνθήκες (όξινες, βασικές, σχετικά υψηλή θερμοκρασία). [92] Επιπρόσθετα, υφίστανται αρκετά ένζυμα, τα οποία διασπούν αυτούς τους δεσμούς και κυρίως είναι πρωτεάσες σερίνης, κυστεΐνης ή μεταλλοπρωτεάσες, όπως επίσης και αμιδάσες ή εστεράσες. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του όγκου, οι καθεψίνες (cathepsins, cathepsin B,L,S,D,E), ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεασών κυστεΐνης και σχετίζονται με την μετάσταση και την αγγειογένεση, υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα. Είναι ένζυμα, τα οποία συνήθως εντοπίζονται στα λυσοσώματα, ενεργοποιούνται σε όξινες συνθήκες και καταλύουν τη διάσπαση αμιδικών δεσμών. Επιπρόσθετα, αρκετές αμιδάσες, που διασπούν αμιδικούς

δεσμούς, έχουν αναφερθεί πως υπερεκφράζονται σε διάφορους τύπους καρκίνου. Αξίζει να αναφερθεί πως η ιδιότητα αυτών των ενζύμων έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την ανάπτυξη μορίων, που φέρουν αντικαρκινικά φάρμακα, όπως η δοξορουβικίνη, τα οποία ενεργοποιούνται μετά την αποκοπή του αμιδικού δεσμού. [93][94][95][96][97][98][99][100][101][102]

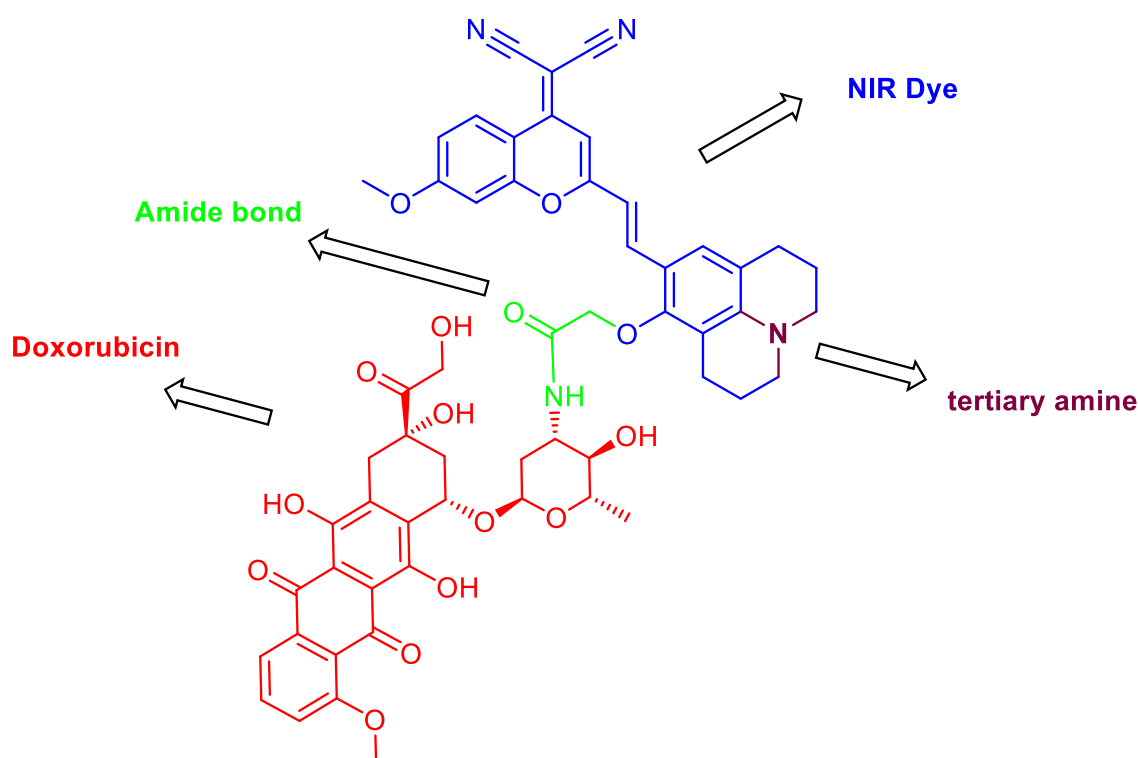
Συνοψίζοντας, σχεδιάσαμε μία ένωση η οποία:

A) Φέρει έναν φθορίζων παράγοντα στην περιοχή NIR (ανάλογο του 2-(2-μεθυλ-4H-χρωμεν-4-υλιδενο)μαλονονιτριλίου), ο οποίος ανταποκρίνεται σε μεταβολές του ιζώδους

B) Μία ομάδα στόχευσης των λυσοσωμάτων (τριτοταγής αμίνη)

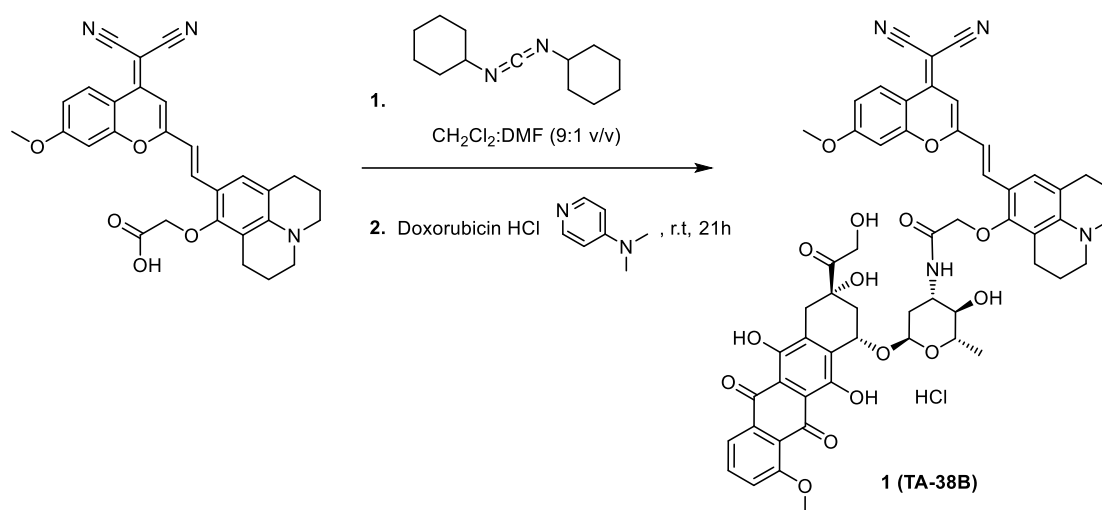
Γ) Έναν κυτταροτοξικό παράγοντα, τη δοξορουβικίνη

Δ) Έναν συνδέτη φαρμάκου-χρωστικής (αμιδικός δεσμός), ο οποίος διασπάται από ένζυμα που υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα



Εικόνα 83. Δομή της θεραπευτικής ένωσης 1. (TA-38B)

### 3.2.2 Σύνθεση της θεραπευγνώστικής ένωσης 1 (TA-38 B)



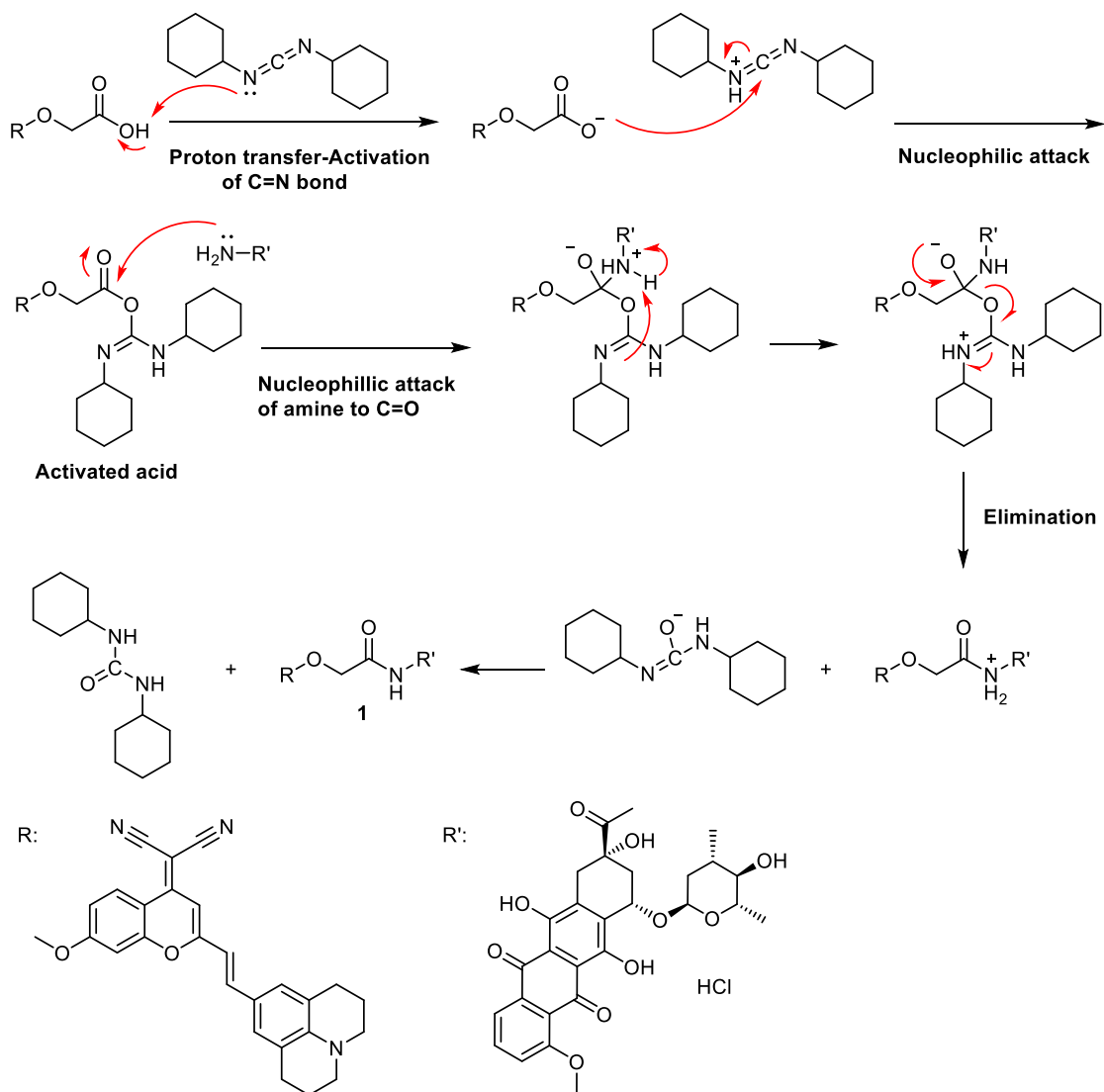
**Εικόνα 84.** Αντίδραση σχηματισμού της θεραπευγνώστικής ένωσης 1 (TA-38B).

#### Πειραματική πορεία

Σε διάλυμα της ένωσης 12 (15 mg, 0,0303 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο:N,N-διμεθυλφορμαμίδιο (9:1 v/v, 5ml) προστέθηκε το N,N'-δικυκλοεξυλ-καρβοδιμίδιο (9,4 mg, 0,0454 mmol) και το διάλυμα αναδεύτηκε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό ροή  $\text{N}_2$ . Έπειτα, ακολούθησε η προσθήκη της δοξορουβικίνης (17,6 mg, 0,0303 mmol) και της 4-διμεθυλαμινο-πυριδίνης (DMAP, 4,07 mg, 0,0333 mmol) και το διάλυμα αναδεύτηκε για 21 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών 5% v/v μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο, όπου διαπιστώθηκε η πλήρης κατανάλωση των αντιδρώντων. Οι διαλύτες απομακρύνθηκαν με απόσταξη σε υψηλό κενό και το υπόλειμμα εκχυλίστηκε με διχλωρομεθάνιο (2x 25 ml). Οι οργανικές φάσεις συνενώθηκαν και ξηράθηκαν με άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και ο διαλύτης απομακρύνθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Η απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (Silica gel) σε σύστημα διαλυτών μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο (αρχικά 100% διχλωρομεθάνιο έως 1,5% v/v μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο, ποσοστό στο οποίο εκλούστηκε το επιθυμητό προϊόν), και παραλήφθηκε μωβ στερεό σε απόδοση 63% (19,5 mg).

#### Πιθανός μηχανισμός της εν λόγω αντίδρασης

Η σύνθεση της θεραπευγνώστικής ένωσης 1 περιλαμβάνει τη σύζευξη μέσω αμιδικού δεσμού με χρήση DCC ως αντιδραστήριο σύζευξης, όπως περιγράφηκε από τους Sheehan και Hess (1955). Ο μηχανισμός περιλαμβάνει τον σχηματισμό του αμιδικού δεσμού, μέσω ενός ενδιάμεσου O-ακυλο-ισοουρίας.

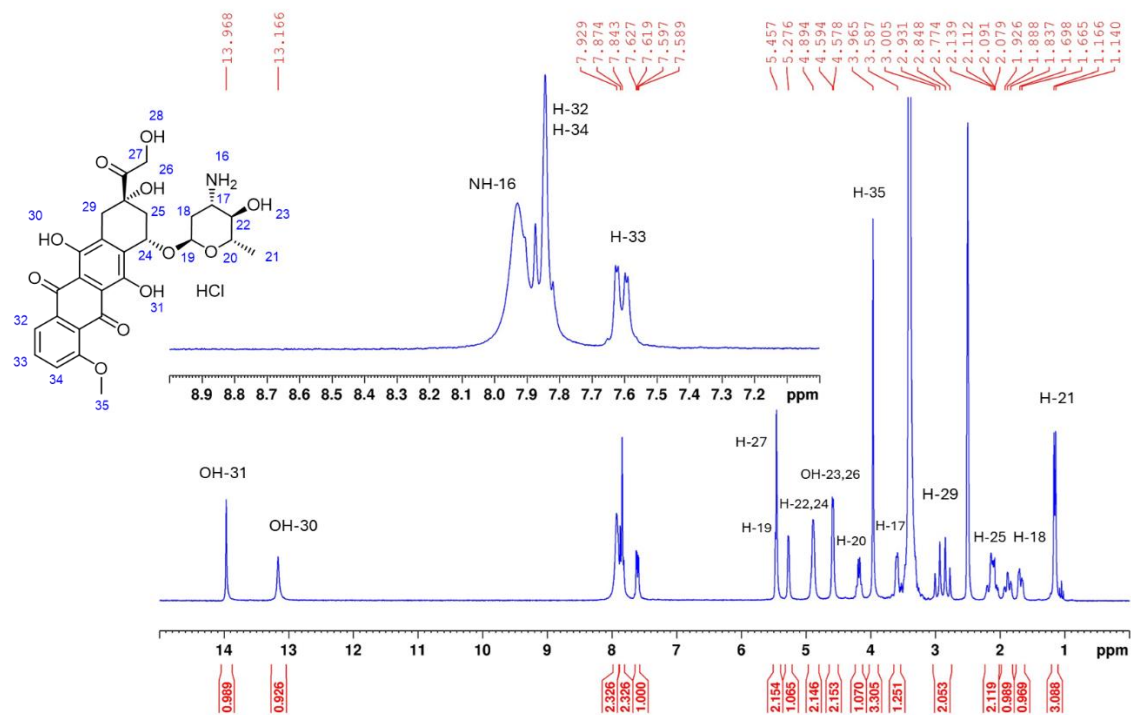


**Εικόνα 85.** Αναπαράσταση του προτεινόμενου μηχανισμού σύνθεσης της θεραπευγνώστικής ένωσης 1.

Ταυτοποίηση της θεραπευγνώστικής ένωσης 1

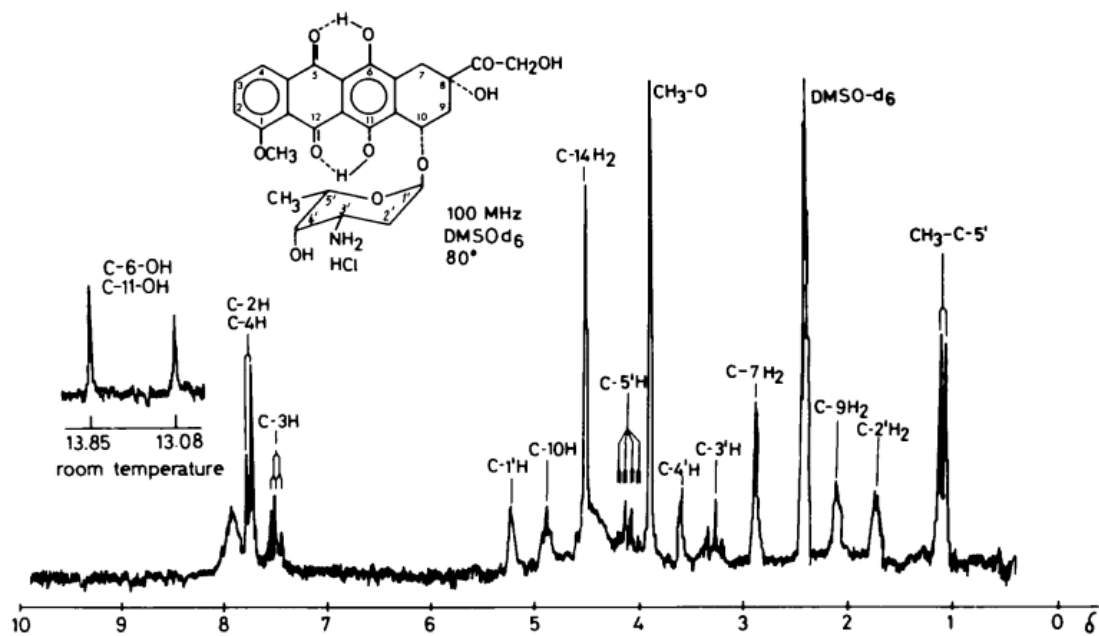
Για να γίνει πιο εύκολη η ταυτοποίηση της ένωσης έγινε λήψη φάσματος NMR για τη δοξορουβικίνη, ώστε να μπορεί να γίνει σύγκριση.



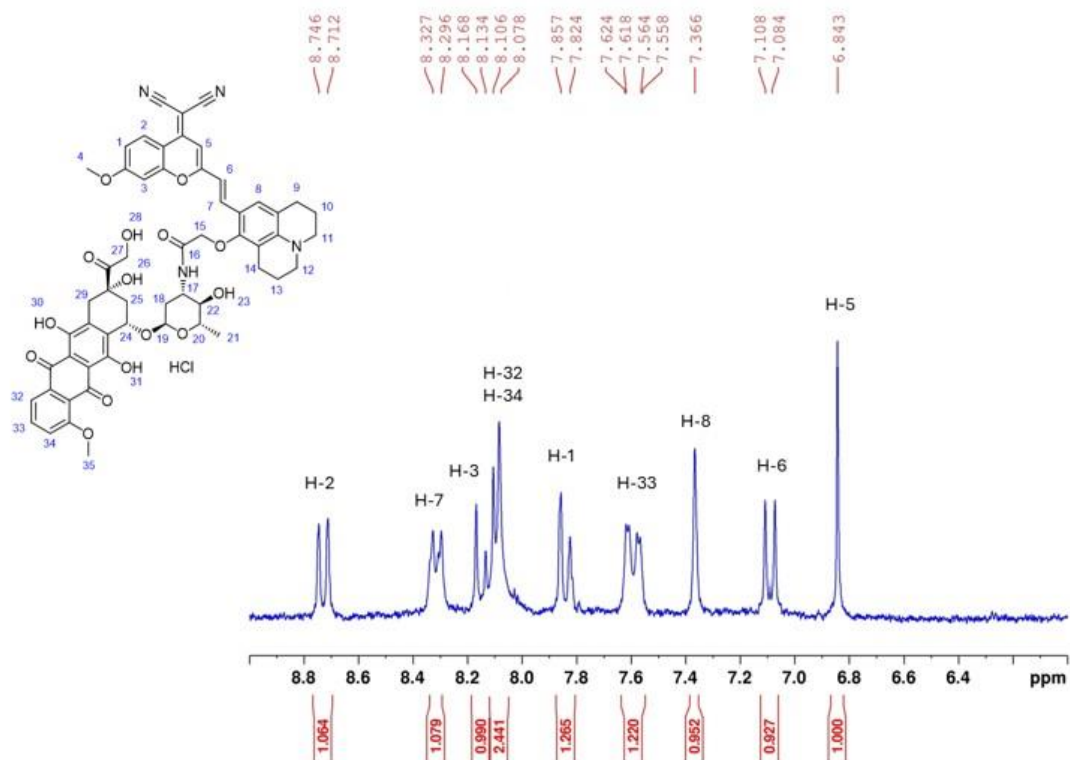
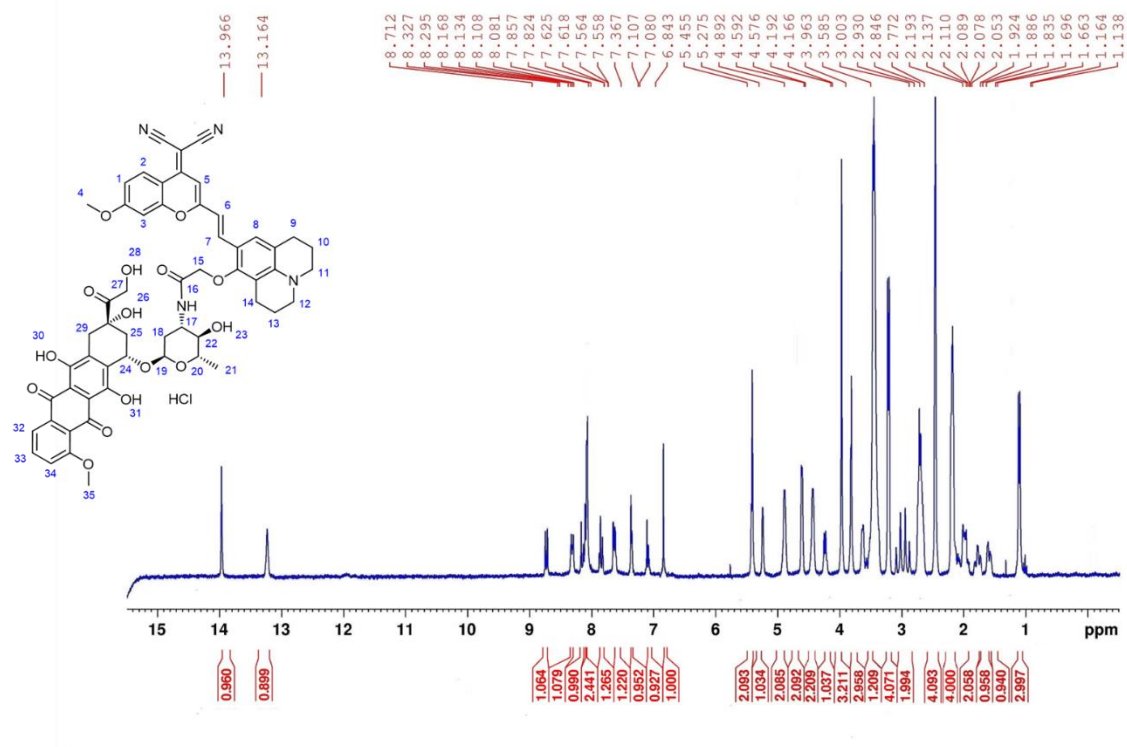


Εικόνα 86. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της δοξορουβικίνης και μεγέθυνση στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων σε διαλύτη  $\text{DMSO-}d_6$  (250 MHz, 25 °C).

Η ταυτοποίηση των πρωτονίων της δοξορουβικίνης έγινε σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα.

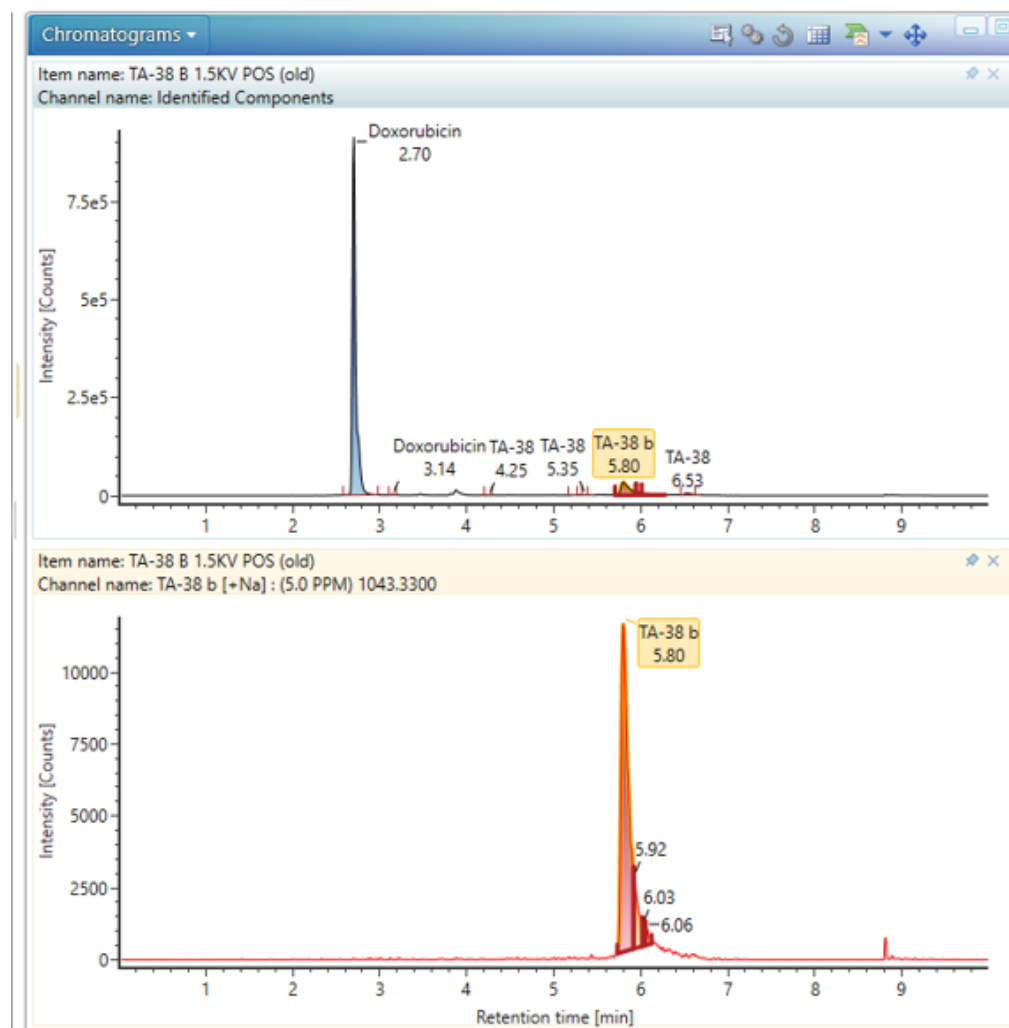


Εικόνα 87. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της δοξορουβικίνης. [103]

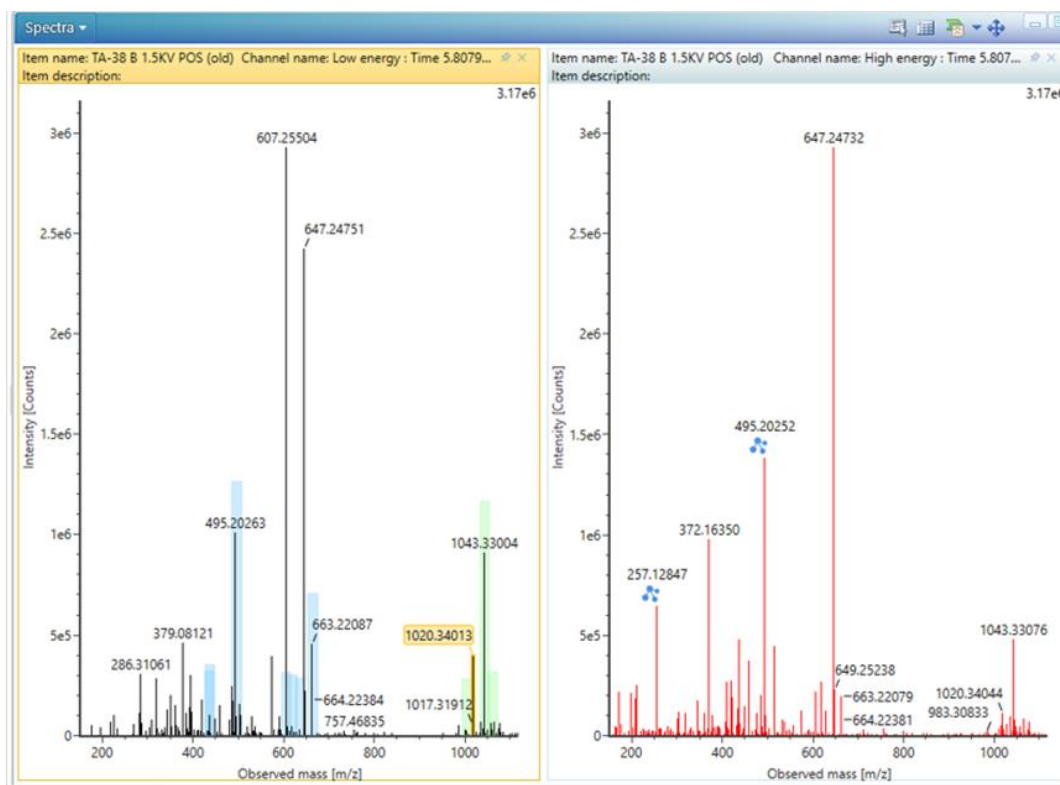


**Εικόνα 88.** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **TA-38B** και μεγέθυνση στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων σε διαλύτη  $\text{DMSO}-d_6$  (250 MHz, 25 °C).

**$^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO):**  $\delta$  13.97 (s, 1H, OH-31), 13.17 (s, 1H, OH-30), 8.72 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H-2), 8.31 (d,  $J = 15.1$  Hz, 1H, H-7), 8.17-8.07 (m, 3H, H-3 και H-32, H-34), 7.84 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H-1), 7.59 (dd,  $J = 7.5, 2.2$  Hz, 1H, H-33), 7.36 (s, 1H, H-8), 7.09 (d,  $J = 15.1$  Hz, 1H, H-6), 6.84 (s, 1H, H-5), 5.47 (d,  $J = 4.4$  Hz, 2H, H-27), 5.27 (s, 1H, H-19), 4.89 (s, 2H, H-22,24), 4.62 (s, 2H, H-15), 4.59 (d,  $J = 4.7$  Hz, 2H), 4.18 (d,  $J = 6.7$  Hz, 1H, H-20), 3.96 (s, 3H, H-35), 3.84 (s, 3H, H-4), 3.59 (s, 1H, H-17), 3.21 (t,  $J = 5.6$  Hz, 4H, H-11,12), 3.05 – 2.75 (m, 2H, H-29), 2.66 (t,  $J = 5.4$  Hz, 4H, H-9,14), 2.31 – 2.00 (m, 6H, H-10,13 και H-25), 1.88 (t,  $J = 11.7$  Hz, 1H), 1.75 – 1.63 (m, 1H), 1.15 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, H-21).



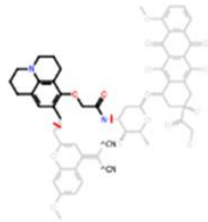
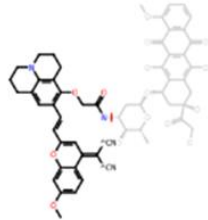
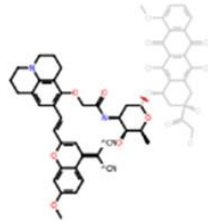
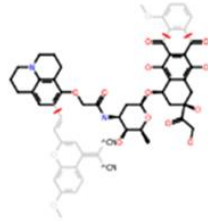
**Εικόνα 89.** Χρωματογράφημα που δείχνει τον χρόνο έκλουσης της θεραπευτικής ένωσης 1 (με κωδικό όνομα TA-38B).



**Εικόνα 90.** Φάσμα μάζας υψηλής ανάλυσης της θεραπευγνωστικής ένωσης 1 (με κωδικό όνομα TA-38B). Η μάζα της ένωσης είναι ίση με 1020.3429. Η κορυφή στο  $m/z$  ίσο με 1020.34013 ταυτίζεται με την προβλεπόμενη μάζα, ενώ η κορυφή στο  $m/z$  ίσο με 1043.330 αντιστοιχεί στο  $[M+Na]^+$ .

**Παρατηρήσεις:**

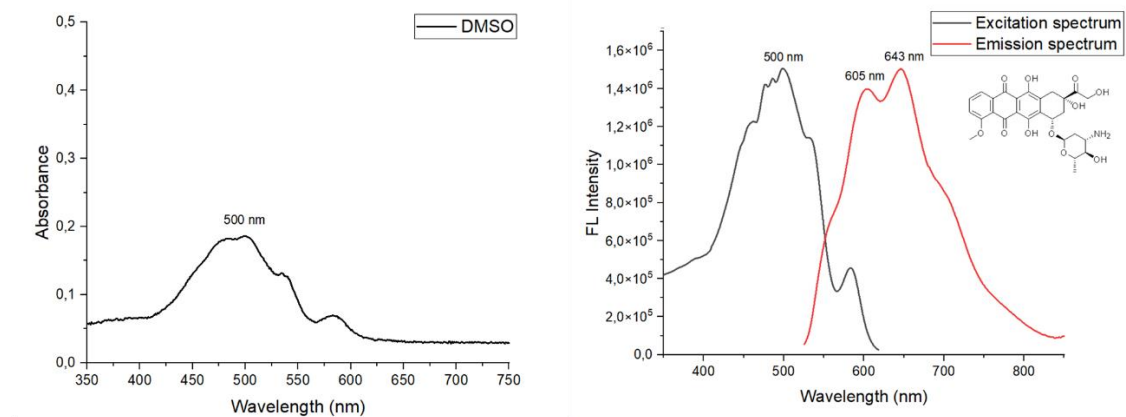
Από το φάσμα μάζας μπορούμε να διαπιστώσουμε την ύπαρξη της επιθυμητής ένωσης, όπως επίσης και από διάφορα θραύσματα που προκύπτουν. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με θεωρητική ανάλυση, οι κορυφές στο  $m/z$  ίσο με 257.128, 495.202, 606.245, 663.220 αντιστοιχούν σε κάποια από τα θραύσματα που είναι πιθανό να προέκυψαν και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

	Observed m/z	Mass error (ppm)	Detector counts	Structure	Formula
1	257.12847	0.07	16027		C15H17N2O2
9	495.20252	-0.33	54737		C29H27N4O4
12	606.24645	-1.39	14648		C35H34N4O6
15	663.22079	3.53	10432		C34H35N2O12

*Εικόνα 91. Παρουσίαση των βασικών θραυσμάτων που παρατηρήθηκαν από την ανάλυση της φασματομετρίας μάζας.*

### 3.2.3 Φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης TA-38 B

Προκειμένου να αξιολογήσουμε τις φωτοφυσικές ιδιότητες της ένωσης TA-38 B, ως εν δυνάμει θεραπευτική ένωση, πραγματοποιήθηκαν πειράματα τόσο με φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους, όσο και φασματοσκοπία φθορισμού. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις απορρόφησης και φθορισμού της δοξορουβικίνης, ώστε να μπορεί να γίνει σύγκριση με αυτά της τελικής ένωσης, καθώς το ίδιο το φάρμακο φέρει αξιοσημείωτες φωτοφυσικές ιδιότητες.

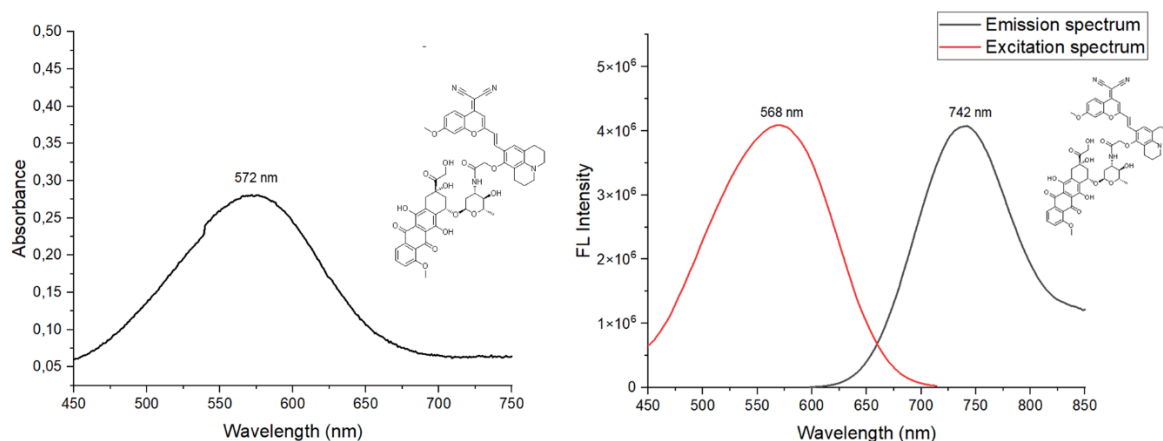


**Εικόνα 92.** Φάσμα απορρόφησης (αριστερά) και φάσματα διέγερσης και φθορισμού (δεξιά) της δοξορουβικίνης (Dox) (συγκέντρωσης 10  $\mu$ M) σε διαλύτη DMSO και θερμοκρασία 37 °C (step 2, ExBw: 5, EmBw: 5).

#### Παρατηρήσεις:

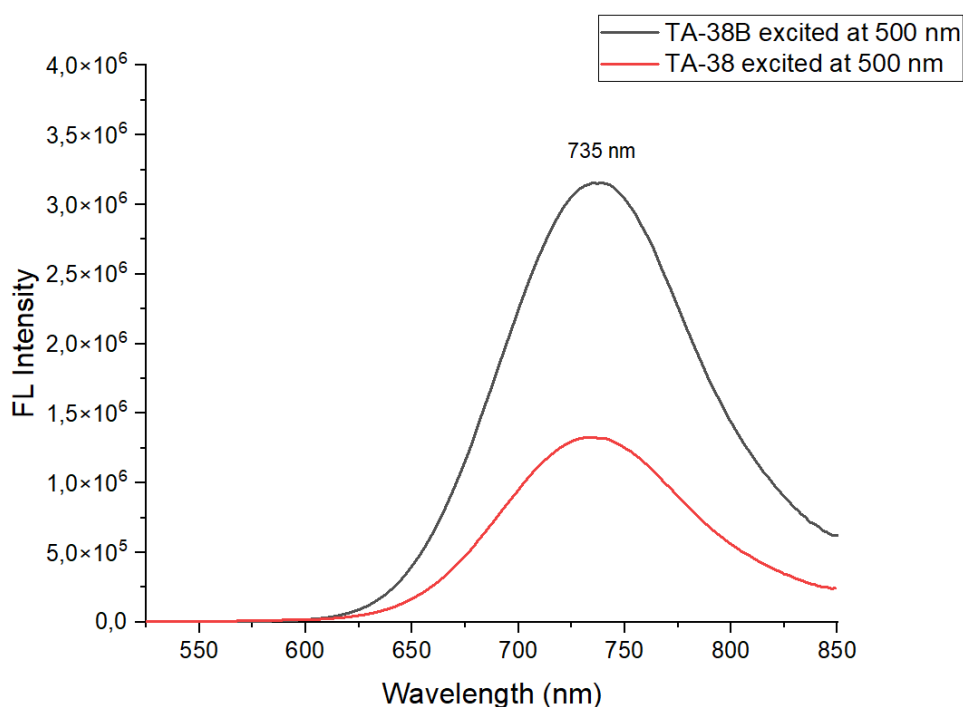
Παρατηρείται πως η δοξορουβικίνη εμφανίζει ένα φάσμα απορρόφησης με μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης τα 500 nm, και ένα φάσμα εκπομπής με δύο κορυφές, μία στα 605 και μία στα 643 nm, οι οποίες προκύπτουν έπειτα από διέγερση στα 500 nm. Στο σημείο αυτό, κάνοντας υπέρθεση τα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού, τόσο για την ένωση **12**, όσο και για τη δοξορουβικίνη, διαπιστώσαμε πως υφίσταται μία αλληλεπικάλυψη μεταξύ του φάσματος εκπομπής (emission spectrum) του φαρμάκου και του φάσματος διέγερσης (excitation spectrum) της ένωσης **12**. Έτσι, θελήσαμε να εξετάσουμε αν υφίσταται φαινόμενο μεταφοράς ενέργειας Förster (FRET) μεταξύ του φαρμάκου, το οποίο θα μπορούσε να λειτουργήσει ως δότης ηλεκτρονιακής πυκνότητας, και της ένωσης **12**, η οποία θα μπορούσε να λειτουργήσει ως δέκτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας. [104][105]

Για αυτόν τον λόγο, καταγράφηκαν φάσματα απορρόφησης και φθορισμού του υβριδικού μορίου TA-38B σε ρυθμιστικό διάλυμα 30:70 v/v DMSO:PBS (pH 7.4). Όπως παρατηρούμε στην παρακάτω εικόνα, το υβριδικό μόριο εμφανίζει ένα ευρύ φάσμα απορρόφησης και ένα φάσμα φθορισμού αρκετά παρόμοιο με εκείνο της ένωσης **12** με κορυφή μέγιστης έντασης εκπομπής στα 742 nm. Δεδομένου του ότι το φάρμακο δεν συνδέεται μέσω π-συζυγιακού συστήματος με την ένωση **12**, θα αναμέναμε στο φάσμα εκπομπής να είναι ορατές και οι κορυφές της δοξορουβικίνης στα 605 και 643 nm. Εφόσον κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται, σημαίνει ότι η ενέργεια, με την οποία διεγείρεται η δοξορουβικίνη δεν οδηγεί σε φθορισμό της, αλλά αντ' αυτού μεταφέρεται στην ένωση **12**, ενισχύοντας την ένταση του φθορισμού αυτής.



**Εικόνα 93.** Φάσμα απορρόφησης, διέγερσης και φθορισμού της ένωσης TA-38B (συγκέντρωσης 10  $\mu\text{M}$ ) σε ρυθμιστικό διάλυμα 30:70 ν/ν DMSO:PBS (pH 7.4), σε θερμοκρασία 37°C (step 2, ExBw: 5, EmBw: 5.)

Άλλη μία ένδειξη που πιθανώς επιβεβαιώνει την ύπαρξη του φαινομένου FRET είναι η σύγκριση των φασμάτων εκπομπής των ενώσεων TA-38 και TA-38B (ίδιας συγκέντρωσης), όταν αυτές διεγείρονται με ακτινοβολία στα 500 nm, μήκος κύματος που ταυτίζεται με το μήκος κύματος διέγερσης της δοξουροβικίνης. Καταρχάς, και στις δύο ενώσεις είναι παρόν το φαινόμενο ICT. Η επιπλέον ενίσχυση της έντασης φθορισμού, που παρατηρείται στην ένωση TA-38B πιθανώς οφείλεται στο φαινόμενο FRET, δηλαδή στη μεταφορά ενέργειας από τη δοξουροβικίνη στη χρωστική.

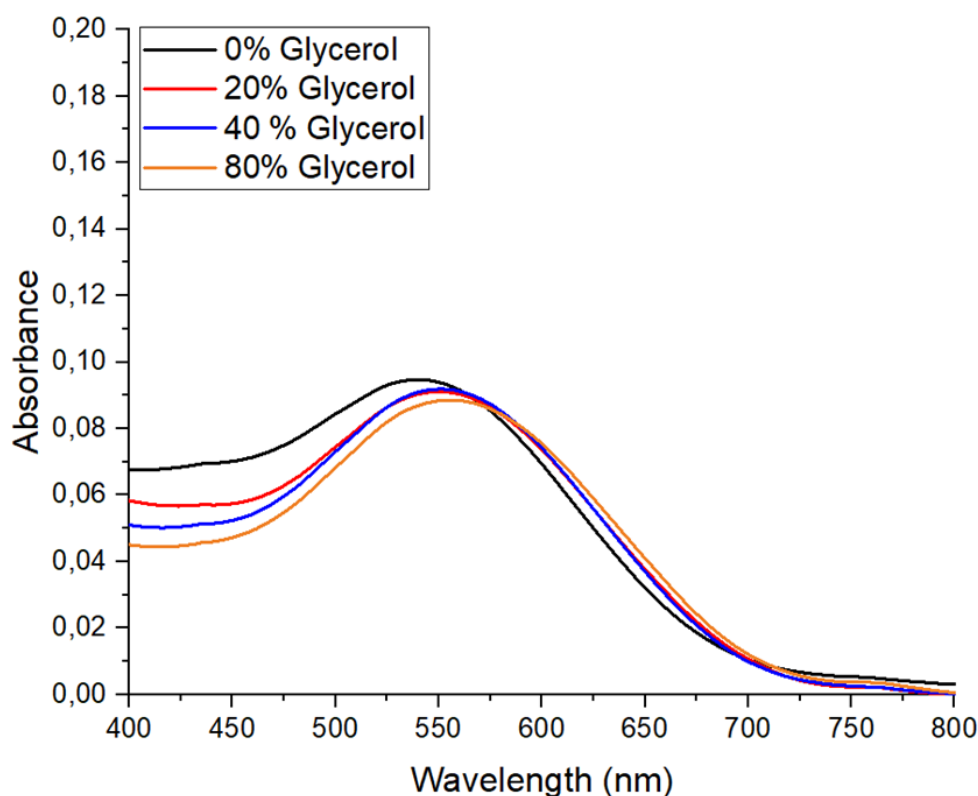


**Εικόνα 94.** Φάσματα φθορισμού των ενώσεων TA-38 και TA-38B (συγκέντρωσης 10  $\mu\text{M}$ ) σε διαλύτη DMSO και θερμοκρασία 37°C, με διέγερση στα 500 nm (step 2, ExBw: 5, EmBw: 5).

Εφόσον διαπιστώσαμε πως η ένωση TA-38B εκτός του ICT εμφανίζει και το FRET φαινόμενο, θελήσαμε να αξιολογήσουμε την απόκριση της ένωσης αυτής στο ιζώδες και το pH.

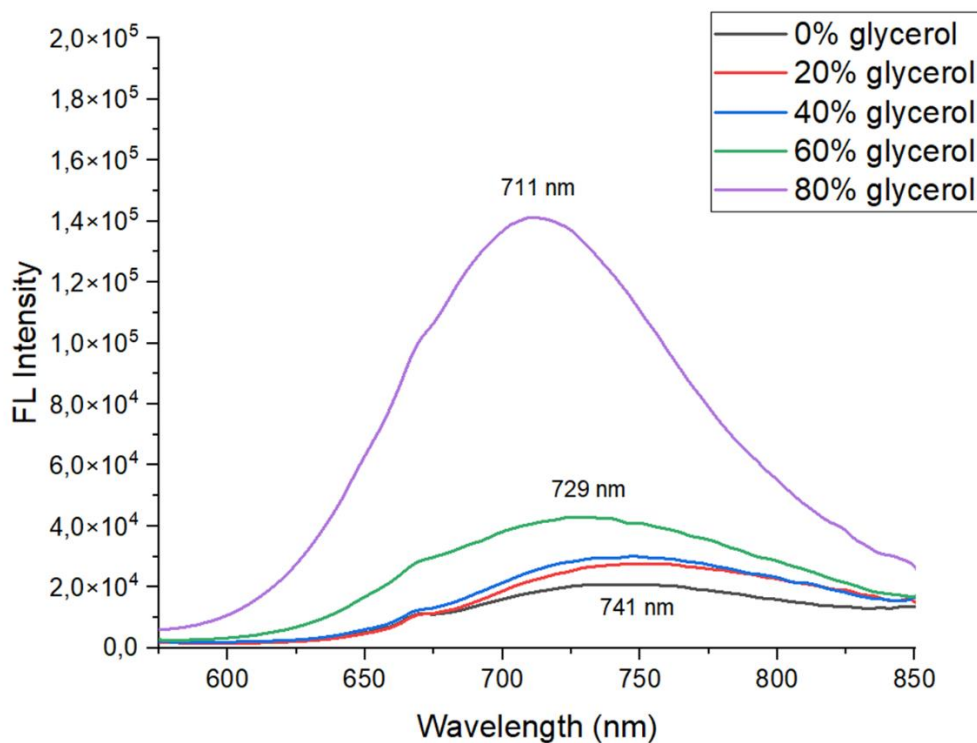
### 3.2.3.1 Έλεγχος απόκρισης της ένωσης TA-38B σε μεταβολές του ιξώδους

Για να αξιολογήσουμε την απόκριση της ένωσης **TA-38B** στη μεταβολή του ιξώδους, πραγματοποιήθηκαν πειράματα, τόσο μέσω φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους, όσο και φασματοσκοπίας φθορισμού χρησιμοποιώντας διαφορετικά δυαδικά μίγματα γλυκερόλης/νερού (από 0% έως 80%), σε θερμοκρασία 37 °C. Όπως παρατηρούμε στην **Εικόνα 96**, η ένωση εμφανίζει ένα σημαντικό σήμα φθορισμού ακόμα και σε υδατικό μέσο, το οποίο πιθανώς οφείλεται στην καλύτερη διαλυτότητα της ένωσης λόγω της παρουσίας του φαρμάκου, και δεν αυξάνεται σημαντικά σε διαλύματα με αυξημένο το ποσοστό γλυκερόλης (αύξηση **7 φορές** από 0% γλυκερόλη στο 80% γλυκερόλη). Επίσης, αυτή η μικρή αύξηση κυρίως λαμβάνει χώρα από το διάλυμα 60% γλυκερόλη στο 80% γλυκερόλη.



**Εικόνα 95.** Φάσματα απορρόφησης της ένωσης **TA-38B** (συγκέντρωσης 10  $\mu\text{M}$ ) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης-νερού (από 0% έως 99% γλυκερόλη), σε θερμοκρασία 37 °C.

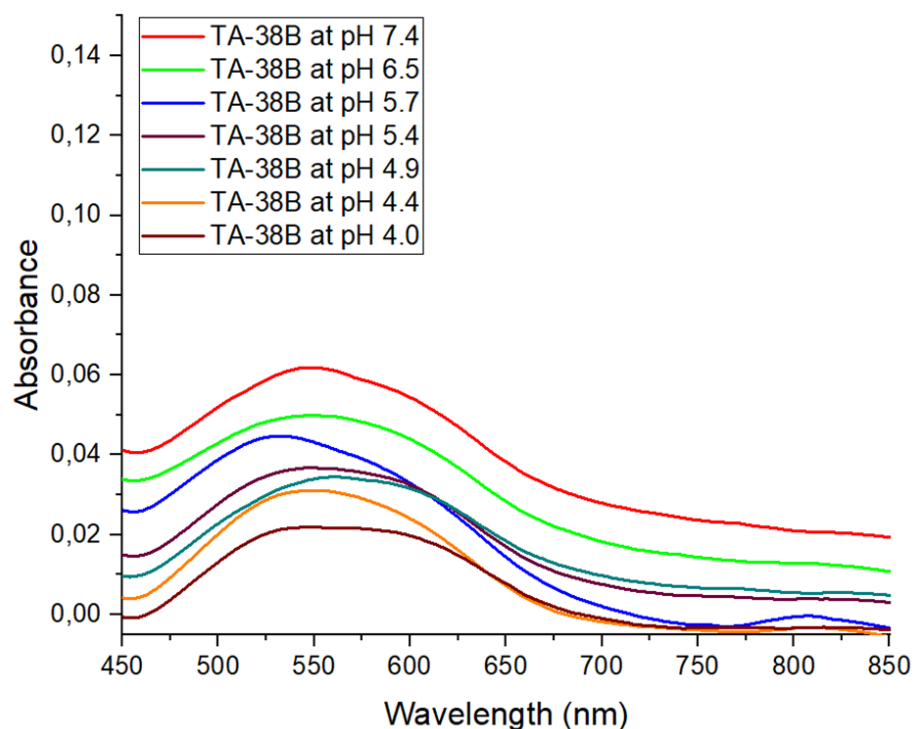




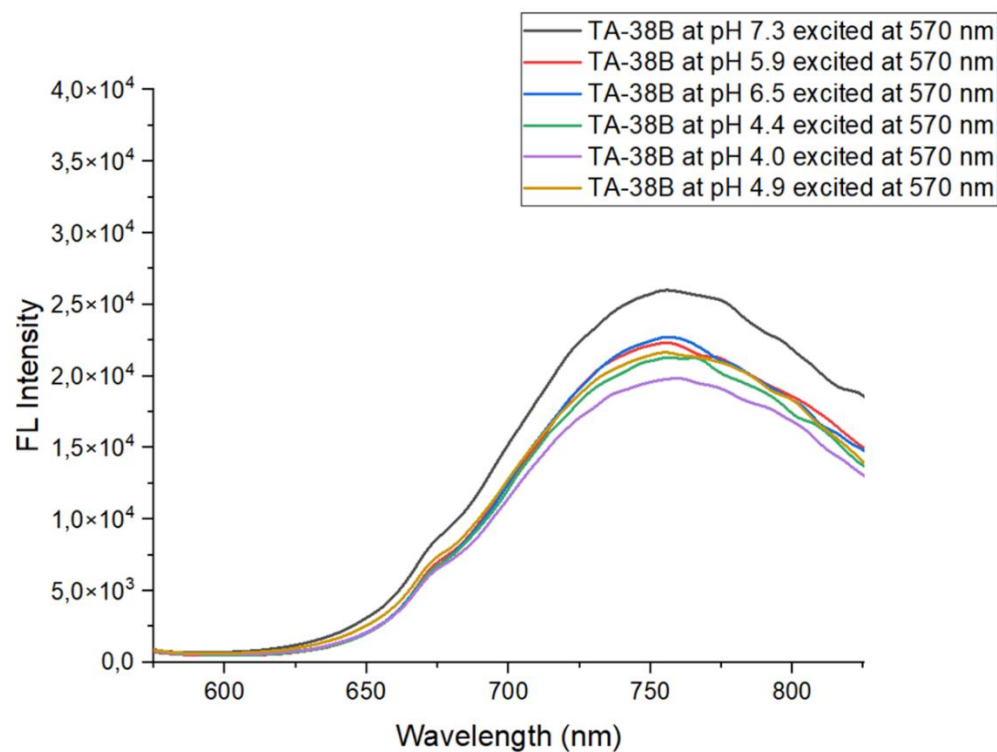
**Εικόνα 96.** Φάσματα φθορισμού της ένωσης **TA-38B** (συγκέντρωσης 10  $\mu\text{M}$ ) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης-νερού (από 0% έως 80% γλυκερόλη), σε θερμοκρασία 37 °C, κατόπιν διέγερσης στα 570 nm. (step 2, ExBw: 5, EmBw: 5)

### 3.2.3.2 Έλεγχος απόκρισης της ένωσης TA-38B σε μεταβολές του pH

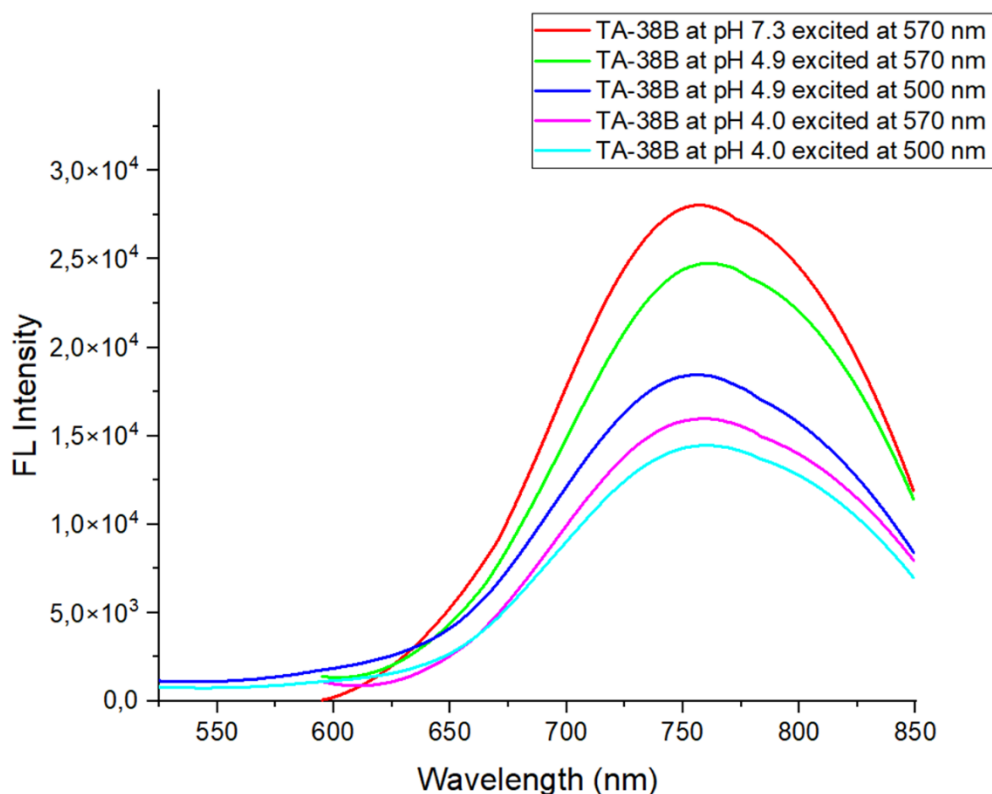
Για να ελέγξουμε την απόκριση της ένωσης σε μεταβολές του pH, πραγματοποιήσαμε πειράματα σε διαφορετικές τιμές pH, όπως έγινε και με την ένωση **12**, με χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων κίτρικών αλάτων. [88] Επιπλέον, καταγράφηκαν φάσματα φθορισμού σε διάφορες τιμές pH με διέγερση τόσο στα 570 nm, όπου διεγείρεται η χρωστική, αλλά και στα 500 nm, όπου είναι το μήκος κύματος διέγερσης του φαρμάκου. Δεν έγινε χρήση DMSO για αύξηση της διαλυτότητας της ένωσης, όπως με την ένωση **12**, καθώς η ένωση **TA-38B** για συγκεντρώσεις της τάξης των 10  $\mu\text{M}$  είναι διαλυτή στο νερό. Αυτό που παρατηρήθηκε, είναι ότι η ένωση **TA-38B** δεν εμφανίζει κάποια αλλαγή στον φθορισμό της ως απόκριση στις μεταβολές του pH. Αυτό βέβαια δεν σημαίνει ότι δεν υφίσταται πρωτονίωση της τριτοταγούς αμίνης σε χαμηλές τιμές pH και περιορισμός του ICT φαινομένου, καθώς στην περίπτωση της ένωσης αυτής είναι παρόν το φαινόμενο FRET, το οποίο δεν διαταράσσεται από τις αλλαγές του pH και συνεισφέρει επιπρόσθετα στον φθορισμό της **TA-38B**. Αυτός είναι και ο λόγος που δεν παρατηρείται πολύ μεγάλη αλλαγή στον φθορισμό μεταξύ των διαλυμάτων pH 4.0 και pH 7.4.



**Εικόνα 97.** Φάσματα απορρόφησης της ένωσης TA-38B (συγκέντρωσης 10  $\mu\text{M}$ ) σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα κιτρικών, σε θερμοκρασία 37°C.



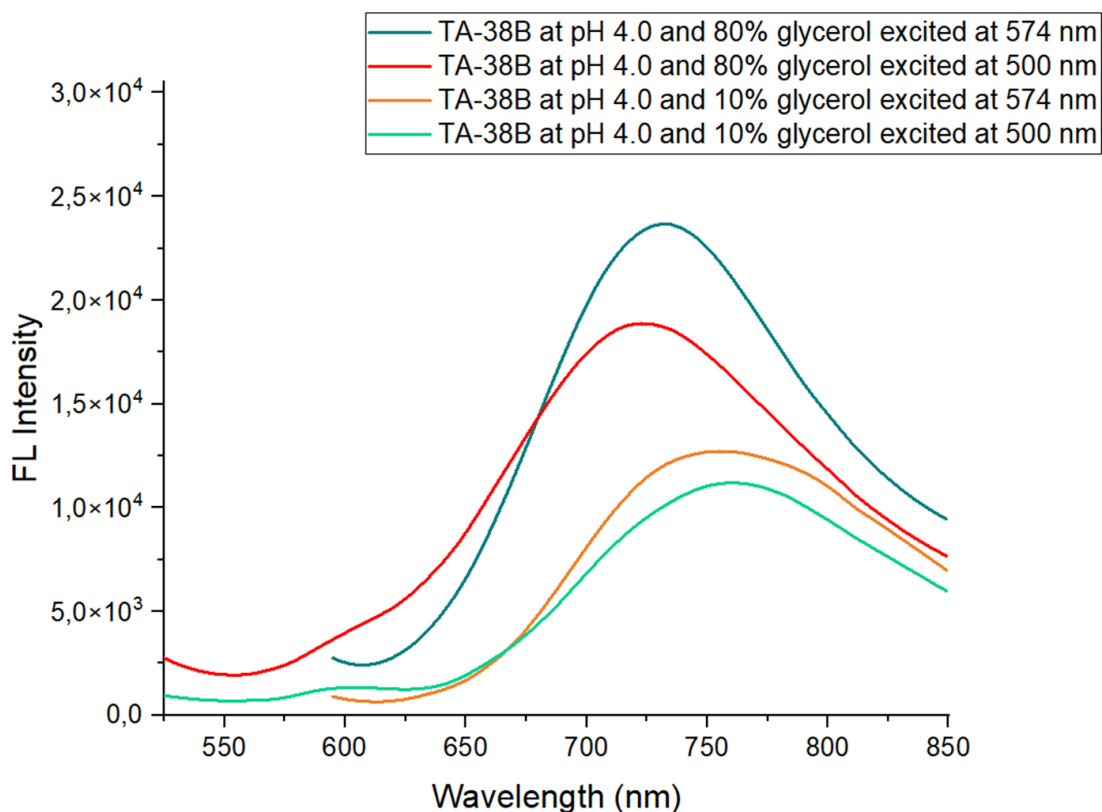
**Εικόνα 98.** Φάσματα φθορισμού της ένωσης TA-38B (συγκέντρωσης 10  $\mu\text{M}$ ) σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα κιτρικών, σε θερμοκρασία 37°C, με διέγερση στα 570 nm (step 2, ExBw: 5, EmBw: 5).



**Εικόνα 99.** Φάσματα φθορισμού της ένωσης TA-38B (συγκέντρωσης 10  $\mu$ M) σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα κίτρικών, σε θερμοκρασία 37°C, με διέγερση στα 500 nm και 570 nm (step 2, ExBw: 5, EmBw: 5).

### 3.2.3.3 Έλεγχος των φωτοφυσικών ιδιοτήτων της ένωσης TA-38B σε συνθήκες που προσομοιάζουν τόσο τα λυσοσώματα των υγιών όσο και των καρκινικών κυττάρων

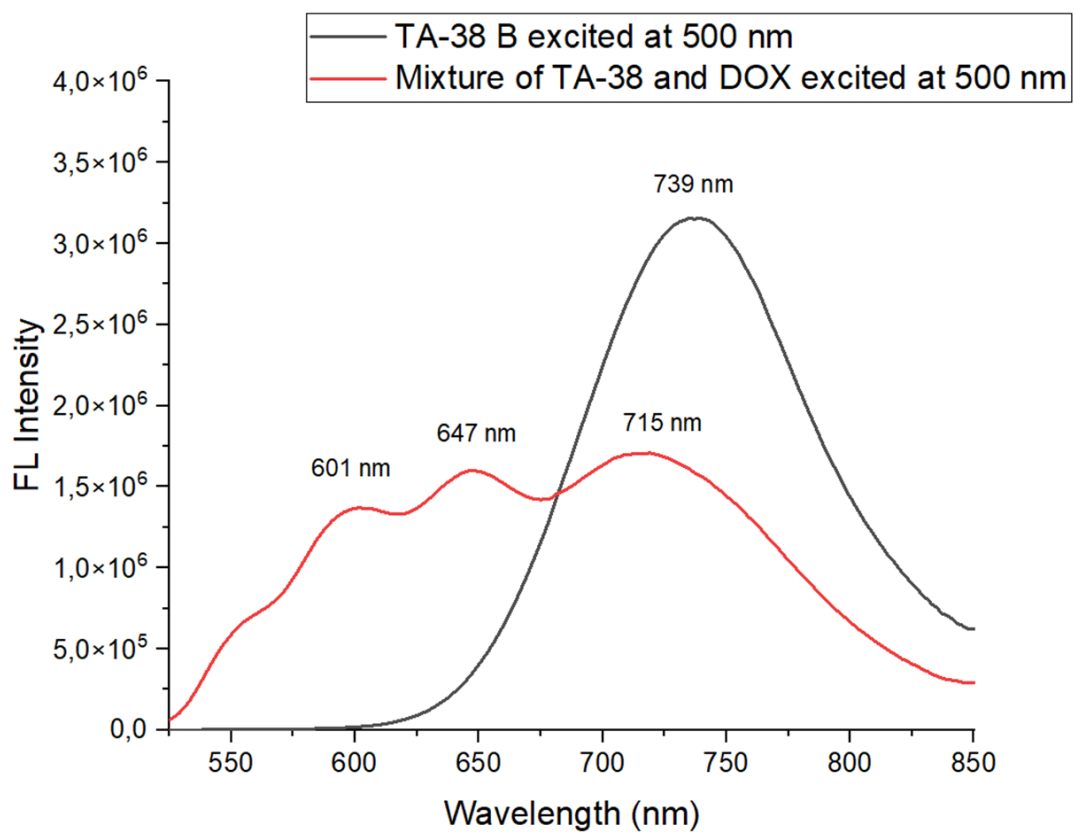
Όπως πραγματοποιήθηκε και για την ένωση **12**, έτσι και για την ένωση **TA-38B** έγιναν πειράματα μέτρησης φθορισμού σε συνθήκες που προσομοιάζουν, όσο είναι εφικτό, αυτές των λυσοσωμάτων τόσο στα υγιή, όσο και στα καρκινικά κύτταρα. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι η ένωση αν βρεθεί στο χαμηλό pH των λυσοσωμάτων, έχει παρόμοιες φωτοφυσικές ιδιότητες είτε σε υψηλό, είτε σε χαμηλό ιξώδες, με ελάχιστη αύξηση της έντασης φθορισμού (2 φορές) σε υψηλό ιξώδες. Η απουσία κάποιας αξιοσημείωτης αλλαγής στην ένταση του φθορισμού είναι επακόλουθο της παρουσίας του φαινομένου FRET, το οποίο δεν επιτρέπει την παρακολούθηση κάποιας αλλαγής στον φθορισμό, ακόμα και όταν το ICT περιορίζεται.



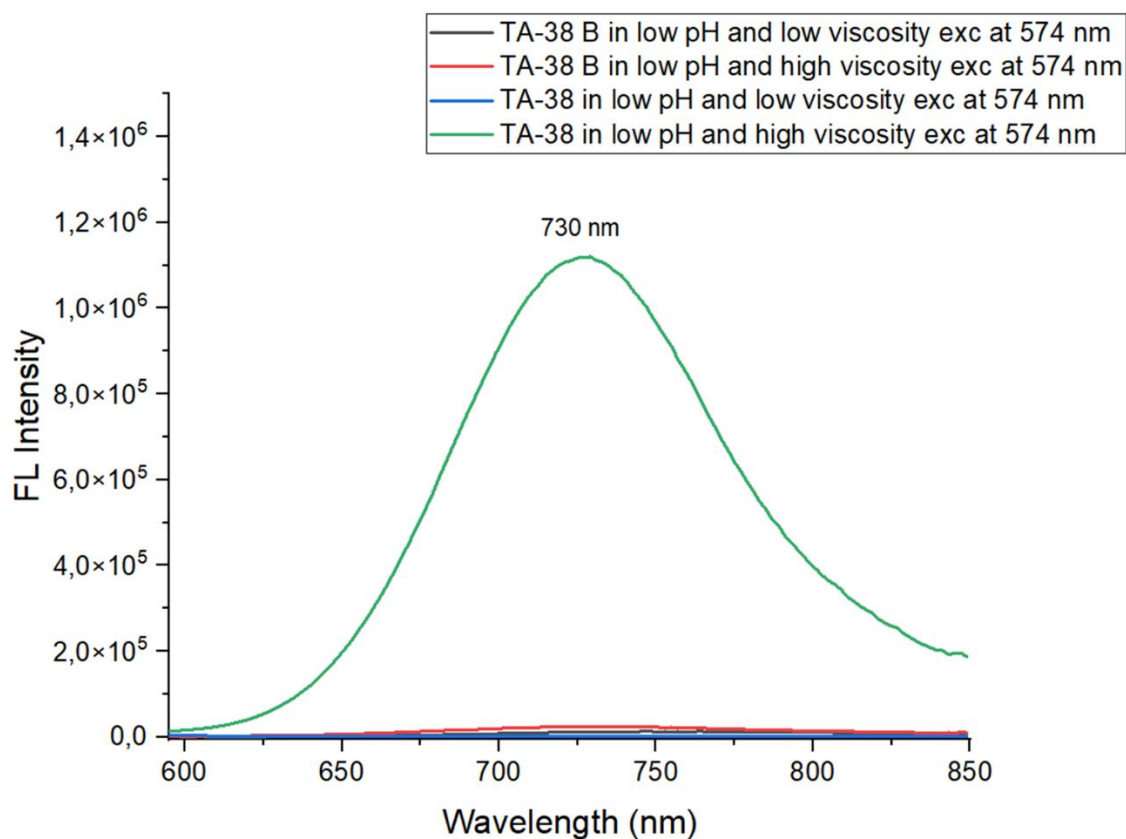
**Εικόνα 100.** Φάσματα φθορισμού της ένωσης TA-38B (συγκέντρωσης 10  $\mu$ M) σε διαλύματα με pH ίσο με 4.0 και με διαφορετικά ποσοστά γλυκερόλης (10% και 80%), σε θερμοκρασία 37°C, με διέγερση στα 500 και 574 nm (step 2, ExBw: 5, EmBw: 5).

### 3.3 Σύνοψη των αποτελεσμάτων από τη μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων της ένωσης TA-38B

Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν μπορούμε να υποθέσουμε πως η ένωση **TA-38B** φθορίζει στην NIR περιοχή, λόγω δύο φαινομένων, του ICT, το οποίο κυρίως οφείλεται στην ικανότητα του τριτοταγούς αζώτου να λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων, και του FRET φαινομένου, λόγω της παρουσία της δοξορουβικίνης, που μεταφέρει ενέργεια στην χρωστική. Όπως λοιπόν παρατηρήσαμε, αν το σύζευγμα χρωστικής-φαρμάκου εισέλθει στο κύτταρο και συγκεκριμένα στα λυσοσώματα θα πρωτονιωθεί, με αποτέλεσμα να χαθεί το ICT φαινόμενο. Παρόλα αυτά η ένωση θα διατηρήσει κάποιον φθορισμό, λόγω του FRET φαινομένου. Ακτινοβολώντας σε αυτό το σημείο την ένωση, θα δώσει ένα σήμα φθορισμού με μέγιστη ένταση κοντά στα 740 nm. Αν το κύτταρο στο οποίο βρεθεί είναι καρκινικό, τότε ο αμιδικός δεσμός, που συνδέει το φάρμακο με τη χρωστική θα διασπαστεί από ένζυμα, που υπερεκφράζονται στα λυσοσώματα των καρκινικών κυττάρων, είτε από τις συνθήκες που επικρατούν, όπως το χαμηλό pH. Έτσι, πλέον θα υπάρχουν δύο ξεχωριστά μόρια, το φάρμακο και η χρωστική. Ακτινοβολώντας λοιπόν στα 500 nm μετά τη διάσπαση του δεσμού και την απελευθέρωση του φαρμάκου, θα παρατηρήσουμε αλλαγή στον φθορισμό, καθώς πλέον και το φάρμακο φθορίζει στα 600 και 640 nm, λόγω διακοπής του FRET φαινομένου (**Εικόνα 101**). Ταυτόχρονα, η χρωστική αυξάνει ραγδαία, έως και 100 φορές, την ένταση του φθορισμού της, καθώς θα βρίσκεται σε ένα περιβάλλον υψηλού ιξώδους, όπως το καρκινικό (**Εικόνα 102**). Κατά αυτόν τον τρόπο, μπορεί να ανιχνευτεί το καρκινικό κύτταρο και να διακριθεί από το υγιές, αλλά ταυτόχρονα παρέχεται η δυνατότητα παρακολούθησης της απελευθέρωσης του κυτταροτοξικού φαρμάκου σε πραγματικό χρόνο.



**Εικόνα 101.** Φάσματα φθορισμού του συζεύγματος φαρμάκου-χρωστικής (συγκέντρωσης 10  $\mu\text{M}$ ) (μαύρο φάσμα) και ισομοριακού μίγματος δοξορουβικίνης και της ένωσης 12 (συγκέντρωσης 10  $\mu\text{M}$ ) (κόκκινο φάσμα), μετά από διέγερση στα 500 nm, σε θερμοκρασία 37°C (step 2, ExBw: 5, EmBw: 5).



**Εικόνα 102.** Φάσματα φθορισμού του συζεύγματος φαρμάκου-χρωστικής (συγκέντρωσης 10  $\mu\text{M}$ ) και της ένωσης 12 (συγκέντρωσης 10  $\mu\text{M}$ ), μετά από διέγερση στα 574 nm, σε θερμοκρασία 37°C (step 2, ExBw: 5, EmBw: 5). Παρατηρούμε πως σε καρκινικό περιβάλλον το σύζευγμα έχει μια ένταση φθορισμού της τάξης του  $1-2 \times 10^4$ , ενώ αντίστοιχα η χρωστική μετά την απελευθέρωση του φαρμάκου μια ένταση της τάξης του  $1,1 \times 10^6$ . Παρατηρείται κατά αυτόν τον τρόπο μια αύξηση της έντασης του φθορισμού της χρωστικής έως και 90 φορές.

---

## Συμπεράσματα-Συζήτηση Αποτελεσμάτων

---

Στη συγκεκριμένη ενότητα της μεταπτυχιακής διατριβής πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός και η σύνθεση μιας νέας θεραπευτικής ένωσης, η οποία μπορεί εν δυνάμει να λειτουργήσει και ως προφάρμακο, της δοξορουβικίνης, ενός από τα πιο γνωστά χημειοθεραπευτικά φάρμακα, το οποίο εμφανίζει περιορισμένη χρήση λόγω της υψηλής κυτταροτοξικότητάς της. Συγκεκριμένα, η ένωση που συντέθηκε, φέρει μια χρωστική, η οποία σύμφωνα με πειράματα φασματοσκοπίας φθορισμού που πραγματοποιήθηκαν, φθορίζει στην περιοχή του Εγγύς Υπερύθρου (740 nm) και συνδέεται μέσω ενός αμιδικού δεσμού με τη δοξορουβικίνη, η οποία διαθέτει από μόνη της έναν έντονο φθορισμό κοντά στα 600 nm. Το σύζευγμα χρωστικής-φαρμάκου βρέθηκε πως φθορίζει και μέσω του φαινομένου FRET, δηλαδή της μεταφοράς ενέργειας από το φάρμακο προς τη χρωστική. Η ανακάλυψη αυτή άνοιξε μια νέα προοπτική χρήσης του εν λόγω συζεύγματος, ως εργαλείο παρακολούθησης της απελευθέρωσης του φαρμάκου σε πραγματικό χρόνο μέσω του φθορισμού. Όταν το φαινόμενο FRET διακοπεί, αυτό θα συνεπάγεται και τη διάσπαση του αμιδικού δεσμού, καθώς πλέον τα δύο ανεξάρτητα τμήματα (χρωστική και φάρμακο) θα φθορίζουν σε διαφορετικά μήκη κύματος. Το απελευθερωμένο φάρμακο είναι πλέον ικανό να σκοτώσει τα καρκινικά κύτταρα. Επιπλέον, διαπιστώθηκε πως η χρωστική απελευθερωμένη από το φάρμακο ανταποκρίνεται σε μεταβολές του ιξώδους, παράμετρος η οποία εμφανίζεται απορυθμισμένη στα καρκινικά κύτταρα, και κατά αυτόν τον τρόπο δύναται να αποτελέσει και διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση καρκινικών κυττάρων.

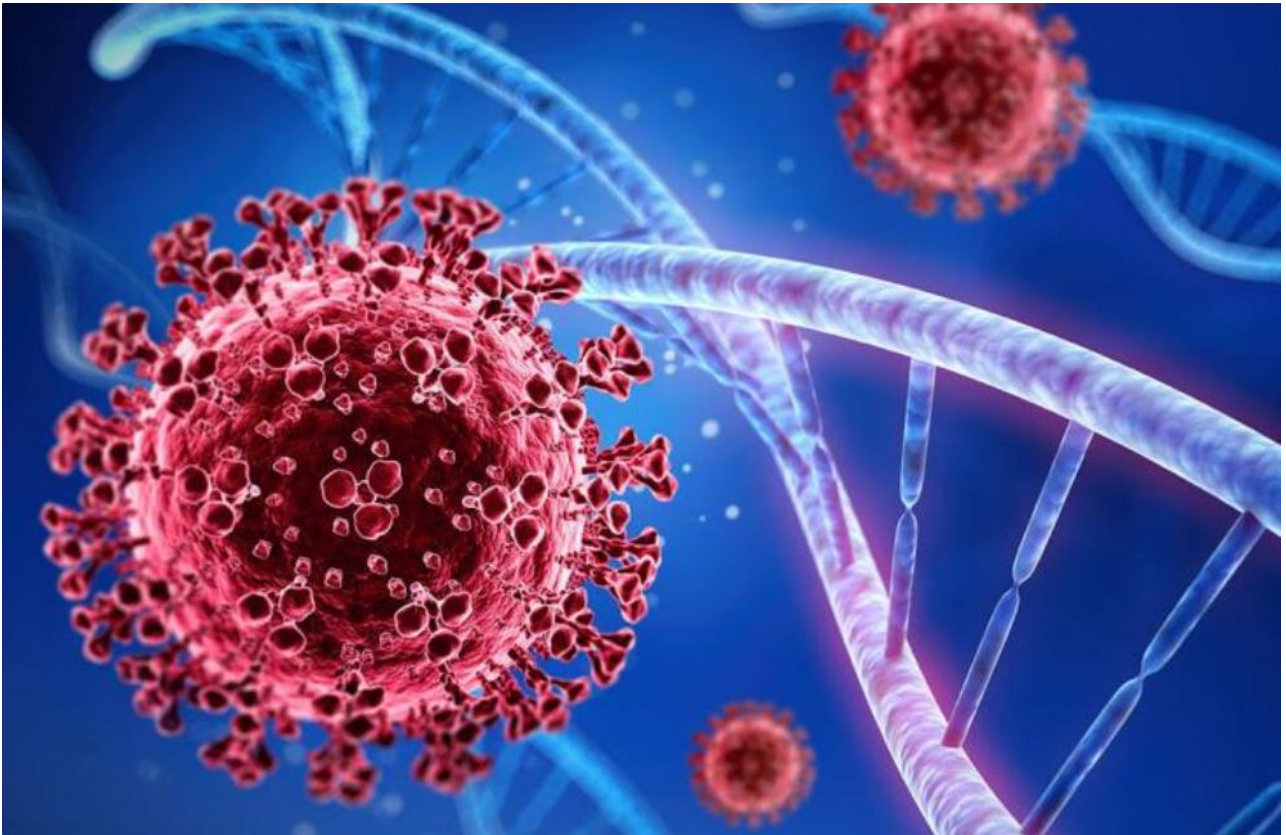
Ορισμένα πρωταρχικά ενδεικτικά αποτελέσματα, τα οποία αφορούν την ικανότητα εισόδου της ένωσης στο κύτταρο, καθώς επίσης και την κυτταροτοξική δράση έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών, όπως αυτή του γλοιώματος, παρουσιάζονται στο **Παράρτημα**. Πρέπει να τονιστεί πως τα πειράματα αυτά θα επαναληφθούν για επαλήθευση των αποτελεσμάτων που έδωσαν.

Μελλοντικοί στόχοι περιλαμβάνουν την αξιολόγηση της κυτταροτοξικής δράσης της ένωσης TA-38B και σε υγιή κύτταρα, ώστε να μπορούμε να αποφανθούμε και για την εκλεκτικότητά της, καθώς επίσης και πειράματα μέτρησης της κυτταροτοξικότητας συναρτήσει του χρόνου (1 έως 5 ημέρες), στα οποία αναμένουμε αύξηση της δράσης κατά το πέρασ των ημερών, γεγονός που θα οφείλεται στην σταδιακή απελευθέρωση του κυτταροτοξικού παράγοντα, δοξορουβικίνη.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΝ SARS-CoV-2





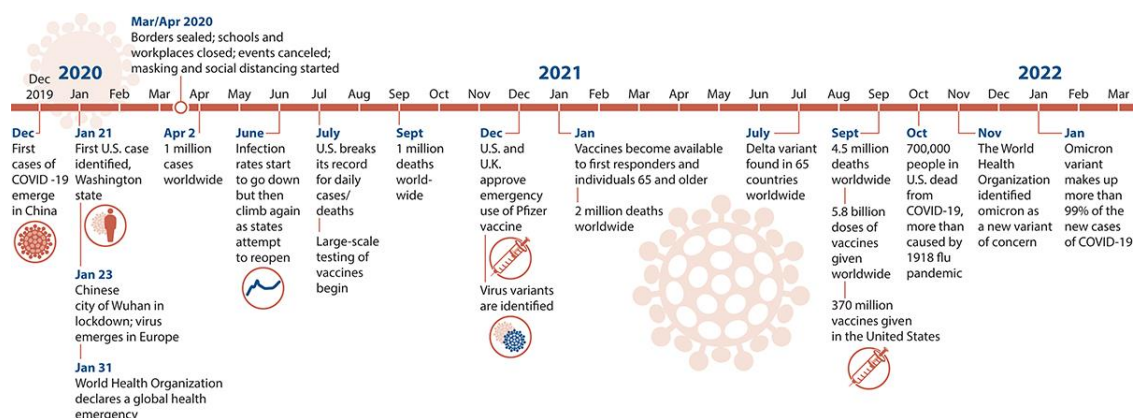
#### 4.1 Εισαγωγικά στοιχεία για τον SARS-CoV-2

Οι κορωνοϊοί (οικογένεια Coronaviridae) είναι κοινά παθογόνα, που μπορούν να προσβάλλουν τόσο τον άνθρωπο, όσο και τα ζώα. Τέσσερις κορωνοϊοί είναι ενδημικοί στον άνθρωπο (ανθρώπινος κορωνοϊός NL63 (HCoV-NL63), HCoV-229E, HCoV-OC43 και HCoV-HKU1) και τυπικά μολύνουν την ανώτερη αναπνευστική οδό, προκαλώντας κοινά συμπτώματα κρυολογήματος. Το 2002 και το 2012, αντίστοιχα, δύο εξαιρετικά παθογόνοι κορωνοϊοί, οι οποίοι προήλθαν από το ζωικό βασίλειο, ο κορωνοϊός, που προκαλεί σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο (Severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV) και ο κορωνοϊός του αναπνευστικού συνδρόμου της Μέσης Ανατολής (Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV), εμφανίστηκαν σε ανθρώπους και προκάλεσαν θανατηφόρα αναπνευστική νόσο. Στα τέλη Δεκεμβρίου του 2019, αρκετές νοσοκομειακές εγκαταστάσεις και κέντρα υγείας στην πόλη Wuhan, στην Κίνα, ανέφεραν ομάδες ασθενών με πνευμονία άγνωστης αιτίας. Ομοίως με τους ασθενείς με SARS και MERS, αυτοί οι ασθενείς εμφάνισαν συμπτώματα ιογενούς πνευμονίας, συμπεριλαμβανομένου πυρετού, βήχα και δυσφορίας στο στήθος και σε σοβαρές περιπτώσεις δύσπνοια και αμφοτερόπλευρη πνευμονία. Μεταξύ των πρώτων 27 τεκμηριωμένων ασθενών που νοσηλεύτηκαν, τα περισσότερα κρούσματα συνδέθηκαν επιδημιολογικά με την Huanan Seafood Wholesale Market, μια αγορά που βρίσκεται στο κέντρο της Wuhan, η οποία πουλά όχι μόνο θαλασσινά αλλά και ζωντανά ζώα, συμπεριλαμβανομένων πουλερικών και ζώων της άγριας φύσης. Στις 31 Δεκεμβρίου, η Δημοτική Επιτροπή Υγείας της Wuhan ειδοποίησε το κοινό για ξέσπασμα πνευμονίας αγνώστου αιτίας και ενημέρωσε τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ). Με μεταγονιδιωματικό προσδιορισμό αλληλουχίας RNA και απομόνωση του ιού, οι επιστήμονες εντόπισαν ότι ο αιτιολογικός παράγοντας αυτής της αναδυόμενης νόσου είναι ένας βήτα κορωνοϊός, που δεν είχε αναφερθεί ξανά. Αν και γενετικά στοιχεία υποδηλώνουν ότι ο SARS-CoV-2 είναι ένας φυσικός ιός, που πιθανότατα προέρχεται από ζώα, δεν υπάρχει ακόμη ασφαλές συμπέρασμα για το πότε και πού εισήλθε για πρώτη φορά ο ιός στους ανθρώπους. [106], [107], [108]

Όσον αφορά την εξάπλωσή του, στις 30 Ιανουαρίου του 2020, ο ΠΟΥ κήρυξε το ξέσπασμα του νέου κορωνοϊού, έκτακτη ανάγκη για τη δημόσια υγεία. Στις 11 Φεβρουαρίου, η Διεθνής Επιτροπή για την Ταξινόμηση των Ιών ονόμασε τον νέο κορωνοϊό «SARS-CoV-2» και ο ΠΟΥ ονόμασε την ασθένεια «COVID-19». Για τον έλεγχο της εξάπλωσης της COVID-19, η Κίνα εφάρμοσε άνευ προηγουμένου αυστηρά μέτρα δημόσιας υγείας. Η πόλη της Wuhan έκλεισε στις 23 Ιανουαρίου και όλα τα ταξίδια και οι συγκοινωνίες που συνδέουν την πόλη αποκλείστηκαν. Τις επόμενες δύο εβδομάδες, όλες οι υπαίθριες δραστηριότητες και συγκεντρώσεις περιορίστηκαν και οι δημόσιες εγκαταστάσεις έκλεισαν στις περισσότερες πόλεις, καθώς και στην ύπαιθρο. Μέχρι τα τέλη Φεβρουαρίου η διεθνής εξάπλωση του ιού επιταχύνθηκε, γεγονός που ανάγκασε τον ΠΟΥ, να αναβαθμίσει την COVID-19 σε πανδημία. Μετά από αυτό, αρκετές χώρες του πλανήτη υιοθέτησαν τα περιοριστικά μέτρα, που εφάρμοσε η Κίνα. Παρόλες τις προσπάθειες, σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία, μέχρι τα τέλη Αυγούστου του 2020, είχαν επιβεβαιωθεί περισσότερα από 20 εκατομμύρια κρούσματα της νόσου, καθώς επίσης είχαν καταγραφεί και περισσότεροι από 733.000 θάνατοι. Από τα εν λόγω στατιστικά δεδομένα, μπορούμε να διαπιστώσουμε την ταχεία εξάπλωση και την σοβαρότητα της νόσου σε παγκόσμια κλίμακα. Προς επίρρωση αυτού, αξίζει να αναφερθεί πως μέχρι και τις αρχές Ιουνίου του 2023, δηλαδή λίγο παραπάνω από 3 έτη από την αρχή της πανδημίας, ο ΠΟΥ έχει καταγράψει 768 εκατομμύρια κρούσματα και 6.942.000 θανάτους, που οφείλονται στον COVID-19. Τέλος, για τα άτομα που νοσούν από τον SARS-CoV-2, έχει αναφερθεί ένα ευρύ φάσμα συμπτωμάτων, από ήπια έως βαριάς μορφής. [109], [110] Τα

συμπτώματα αυτά ενδέχεται να εμφανιστούν από 2 έως 14 ημέρες μετά την έκθεση στον ιό και μπορεί να περιλαμβάνουν:

- Πυρετό
- Βήχα
- Δύσπνοια ή δυσκολία στην αναπνοή
- Μυϊκοί πόνοι και κόπωση
- Απώλεια γεύσης και όσφρησης
- Τάση προς έμετο
- Ρινική συμφόρηση και καταρροή



**Εικόνα 103.** Χρονοδιάγραμμα των σημαντικότερων εξελίξεων σχετικά με την εξάπλωση και την αντιμετώπιση της πανδημίας της COVID-19, από τον Δεκέμβριο του 2019 μέχρι και τον Μάιο του 2022. [111]

Συνοψίζοντας, πριν περάσουμε στην περαιτέρω ανάλυση του ίδιου του ιού, είναι απαραίτητο να κατανοήσουμε το πόσο σημαντική επιρροή είχε η νόσος αυτή, όχι μόνο στην υγεία των ανθρώπων, αλλά και σε ολόκληρο το κοινωνικό σύνολο. Η πανδημία της COVID-19 έχει προκαλέσει μεγάλα προβλήματα στον οικονομικό, κοινωνικό, πολιτικό και ψυχολογικό τομέα και έχει επηρεάσει δισεκατομμύρια ανθρώπους σε όλο τον κόσμο. Λόγω της απομόνωσης και της διακοπής κάποιων κοινωνικών υποθέσεων, η ασθένεια αυτή προκάλεσε προβλήματα όπως κοινωνικό άγχος, πανικό λόγω ανασφάλειας και έντονης παραπληροφόρησης, οικονομική ύφεση και έντονο ψυχολογικό στρες. Για όλους αυτούς τους λόγους, η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει την προσοχή της τα τελευταία τρία χρόνια στην εύρεση τρόπων καταπολέμησης του εν λόγω ιού με διάφορους τρόπους. Για να υλοποιηθεί αυτό, είναι εξίσου σημαντική η κατανόηση της βιολογίας και του τρόπου δράσης του SARS-CoV-2.

#### 4.2 Φυλογενετική και ταξινόμηση του ιού

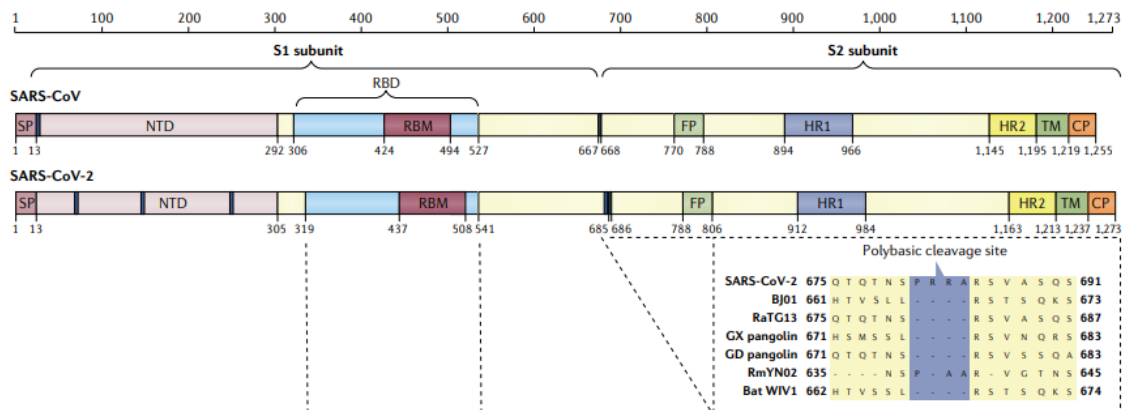
Οι κορωνοϊοί (CoVs) ανήκουν στην οικογένεια των Coronaviridae και διακρίνονται σε 4 γένη (alpha, beta, gamma, delta). Οι άλφα και βήτα κορωνοϊοί προκαλούν συχνότερα λοιμώξεις σε ανθρώπους και θηλαστικά και ειδικότερα, στους βήτα κορωνοϊούς περιλαμβάνονται οι SARS-CoV και MERS-CoV. Πρόκειται για ιούς με περίβλημα, που περιέχουν ένα θετικό, μονόκλωνο γονιδίωμα RNA (+ ssRNA), το οποίο εσωκλείεται μέσα σε ένα πρωτεϊνικό περίβλημα, το καψίδιο. Το καψίδιο αποτελείται από την πρωτεΐνη N (Nucleocapsid, νουκλεοκαψίδιο) και αυτή περιβάλλεται περαιτέρω από μια μεμβράνη, η οποία περιέχει τρεις δομικές πρωτεΐνες: την πρωτεΐνη M (Membrane, μεμβράνης) και την πρωτεΐνη E (Envelope, περίβλημα,

φάκελος), που εμπλέκονται στη διαδικασία εκβλάστησης του ιού, και την πρωτεϊνική ακίδα (Spike, S), που είναι βασικός παράγοντας για την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή.

Ως ένας νέος β-κορωνοϊός, ο SARS-CoV-2 διαθέτει κατά 79 % ίδια αλληλουχία γονιδιώματος με τον SARS-CoV και κατά 50 % με τον MERS-CoV. Η οργάνωση του γονιδιώματός του είναι αρκετά όμοια με άλλους β-κορωνοϊούς. Οι έξι λειτουργικές περιοχές αλληλουχίας του DNA, που βρίσκονται μεταξύ των κωδικονίων έναρξης και λήξης της μετάφρασης (Open Reading Frames, ORFs), είναι διατεταγμένες με κατεύθυνση 5' σε 3' και είναι οι εξής: η, εξαρτώμενη από RNA, πολυμεράση RNA ή ρεπλικάση RNA (ORF1a/ORF1b), η πρωτεϊνική ακίδα (S), το περίβλημα (E), η πρωτεΐνη μεμβράνης (M) και το νουκλεοκαψίδιο (N). Επιπλέον, θεωρούνται επτά επιπρόσθετα ORFs, που κωδικοποιούν βοηθητικές πρωτεΐνες και παρεμβάλλονται μεταξύ των δομικών γονιδίων. Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες, που κωδικοποιούνται από τον SARS-CoV-2 έχουν παρόμοιο μήκος με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες του SARS-CoV. Από τα τέσσερα δομικά γονίδια, ο SARS-CoV-2 εμφανίζει περισσότερο από 90% ταύτιση αλληλουχίας αμινοξέων με τον SARS-CoV εκτός από το γονίδιο S, το οποίο εμφανίζει απόκλιση. Στο 5' άκρο, το γονίδιο ρεπλικάσης καλύπτει τα δύο τρίτα του γονιδιώματος και κωδικοποιεί μια μεγάλη πολυπρωτεΐνη (pp1ab), η οποία διασπάται πρωτεολυτικά σε 16 μη δομικές πρωτεΐνες, που με τη σειρά τους εμπλέκονται στη μεταγραφή και την αντιγραφή του ιού. Οι περισσότερες από αυτές τις μη δομικές πρωτεΐνες του SARS-CoV-2 εμφανίζουν περισσότερο από 85% ταύτιση αλληλουχίας αμινοξέων με τον SARS-CoV. Αντίστοιχα, στο 3' άκρο βρίσκονται κωδικοποιημένες οι δομικές πρωτεΐνες S,E,M,N του ιού. [112], [113], [114], [115]

#### 4.2.1 Διαφοροποίηση του SARS-CoV-2 σε σχέση με άλλους CoVs

Ο SARS-CoV-2 ομαδοποιείται σε ένα ξεχωριστό γένος μαζί με τέσσερα στελέχη κορωνοϊού, που απομονώθηκαν από νυχτερίδες (RaTG13, RmYN02, ZC45 και ZXC21), καθώς και νέους κορωνοϊούς, που εντοπίστηκαν πρόσφατα σε παγκολίνους, οι οποίοι ομαδοποιούνται μαζί με τον SARS-CoV. Παρόλο που σχετίζεται φυλογενετικά, ο SARS-CoV-2 διαφέρει από όλους τους άλλους κορωνοϊούς, κυρίως όσον αφορά την πρωτεϊνική ακίδα S. Στον SARS-CoV-2 αυτή απαρτίζεται από 1.273 αμινοξέα, γεγονός που την καθιστά μεγαλύτερη σε μέγεθος από την αντίστοιχη του SARS-CoV (1.255 αμινοξέα), και άλλων κορωνοϊών του ίδιου γένους (1.245-1.269 αμινοξέα). Στην περιοχή δέσμευσης υποδοχέα (Receptor Binding Domain, RBD) της πρωτεΐνης S, η ομοιότητα αμινοξέων μεταξύ SARS-CoV-2 και SARS-CoV είναι μόνο 73%. Ένα άλλο χαρακτηριστικό του γονιδιώματος του SARS-CoV-2, που τον διαφοροποιεί από τους υπολοίπους, είναι η ύπαρξη τεσσάρων αμινοξέων (PRRA) στη συμβολή των υπομονάδων S1 και S2 της πρωτεΐνης S, όπως παρατηρούμε και στην **Εικόνα 104**. Αυτό δημιουργεί μια πολυβασική θέση διάσπασης (RRAR), που επιτρέπει την αποτελεσματική διάσπαση από πρωτεάσες, π.χ. furin. Μελέτες της δομής του ιού πρότειναν, ότι η θέση διάσπασης από πρωτεάσες μπορεί να μειώσει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 και να διευκολύνει τη διαμορφωτική προσαρμογή, που απαιτείται, για τη δέσμευση στον υποδοχέα. Το εάν η υψηλότερη μεταδοτικότητα του SARS-CoV-2 σε σύγκριση με τον SARS-CoV σχετίζεται με την απόκτηση της θέσης διάσπασης από πρωτεάσες, δεν έχει ακόμη αποδειχθεί. [116]



**Εικόνα 104.** Βασικές διαφορές στην πρωτεϊνική ακίδα του SARS-CoV-2 σε σύγκριση με άλλους κορωνοϊούς.[116]

### 4.3 Δομικά χαρακτηριστικά του SARS-CoV-2

#### 4.3.1 Γλυκοπρωτεΐνη S

Η πρωτεΐνη S είναι μια γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη μεμβράνης τύπου I (150–200 kDa), η οποία αποτελείται από 1273 αμινοξέα και από δύο υπομονάδες, S1 και S2. Η πρωτεΐνη S υπάρχει σε μια τριμερή μορφή προ-σύντηξης, που αργότερα διασπάται από μια πρωτεάση του ξενιστή, όπως η furin. Από τη διάσπαση αυτή προκύπτουν δύο υπομονάδες S1 και S2, οι οποίες μαζί διαθέτουν πολλαπλές λειτουργικές περιοχές, από το άμινο έως το καρβόξυ-τελικό άκρο ως εξής: N-τελική περιοχή (NTD), μοτίβο δέσμησης υποδοχέα (RBM), που περιέχει περιοχή σύνδεσης υποδοχέα (RBD), θέση διάσπασης από furin, πεπτίδιο σύντηξης (FP), κεντρική έλικα (CH), περιοχή σύνδεσης (CD), περιοχή επανάληψης μοτίβου επτά αμινοξέων (HR1/2), διαμεμβρανική περιοχή (TM), και κυτταροπλασματική ουρά (CT). Η N-τερματική υπομονάδα S1 περιέχει την περιοχή δέσμησης υποδοχέα (RBD), η οποία μεσολαβεί στη σύνδεση με τον υποδοχέα του κυττάρου-ξενιστή, δηλαδή με το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης 2 (Angiotensin Converting Enzyme, ACE2). Η δέσμηση του RBD στο ACE2, ακολουθούμενη από διάσπαση της υπομονάδας S2 σε μια δεύτερη ειδική θέση, είναι θεμελιώδης για την ενεργοποίηση της αποσύνδεσης μεταξύ S1 και S2, οδηγώντας σε διαμορφωτικές αλλαγές στην S2. Αυτές οι αλλαγές ευθύνονται για τη σύντηξη των μεμβρανών του ιού και του ξενιστή, καθώς επίσης και για την είσοδο του ιού. Σε αντίθεση με τον SARS-CoV, όπου το όριο S1-S2 διασπάται από την L-καθεψίνη, ο SARS-CoV-2 διαθέτει μια θέση διάσπασης από furin, μεταξύ της υπομονάδας S1 και S2. Η πρωτεάση σερίνης TMPRSS2 είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση της υπομονάδας S2, η οποία τελικά οδηγεί στην παραγωγή της πρωτεΐνης σύντηξης. Είναι ενδιαφέρον ότι η θεραπεία με αναστολείς πρωτεάσης, σε ορισμένες μελέτες, έχει δείξει ότι είναι σε μεγάλο βαθμό αποτελεσματική στην αναστολή της λοίμωξης SARS-CoV-2, υποδεικνύοντας ότι η στόχευση της λειτουργίας της furin και της TMPRSS2 μπορεί να αντιπροσωπεύει μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία.[110], [112], [117]

#### 4.3.2 Πρωτεΐνες Νουκλεοκαψιδίου, Μεμβράνης και Περιβλήματος

Στις δομικές πρωτεΐνες του SARS-CoV-2 περιλαμβάνονται και οι πρωτεΐνες N, M και E. Σε αντίθεση με την πρωτεϊνική ακίδα S, οι δομικές πληροφορίες για αυτές τις πρωτεΐνες είναι περιορισμένες. Η νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη N διαδραματίζει πολύπλευρο ρόλο στην διαδικασία μόλυνσης από τους CoVs. Στον SARS-CoV, η πρωτεΐνη N έχει αναφερθεί ότι δεσμεύεται και "πακετάρει" το ιικό RNA σε σύμπλοκα ριβονουκλεοπρωτεΐνης, RNPs. Τα RNPs βρίσκονται στην εσωτερική πλευρά της ιικής μεμβράνης, σχηματίζοντας ένα ξεχωριστό

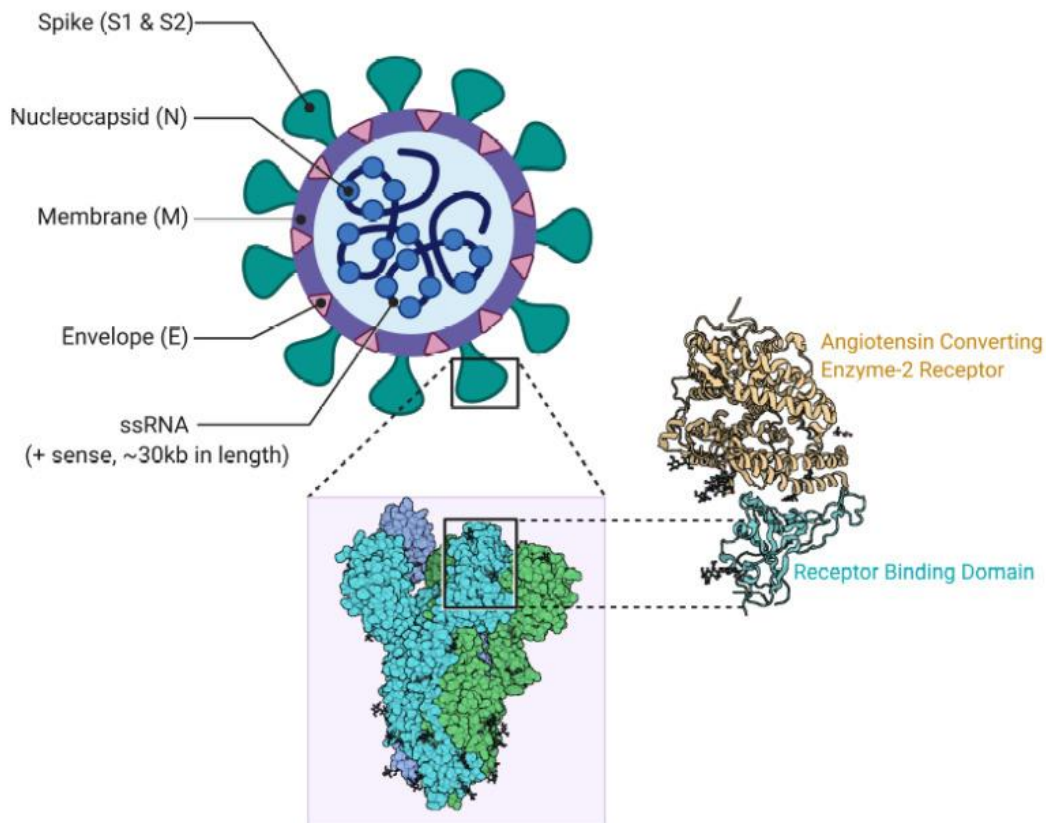
στρώμα από τις πρωτεΐνες M, E και S. Επιπλέον, στον SARS-CoV, η πρωτεΐνη N μετακινείται στο σύμπλεγμα αντιγραφής-μεταγραφής, και έτσι πιστεύεται ότι εμπλέκεται στην αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος.

Η πρωτεΐνη M (25-30 kD) είναι ενσωματωμένη στην ιική μεμβράνη, μέσω τριών διαμεμβρανικών ελίκων. Ο ρόλος της είναι να καθοδηγεί την συναρμολόγηση νέων ιοσωματίων, (δηλαδή ιών εγκλωβισμένων μέσα σε καψίδιο με μόρια DNA και RNA), μέσα στα κύτταρα-ξενιστές. Οι πρωτεΐνες M των κορωνοϊών αποδείχθηκε ότι ολιγομερίζονται στη μεμβράνη του συμπλέγματος Golgi, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν απόπτωση. Οι πρωτεΐνες S, N και E στη συνέχεια στρατολογούνται, μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη M. Έτσι, η πρωτεΐνη M δρα ως ικρίωμα που στρατολογεί τις άλλες δομικές πρωτεΐνες και προάγει την καμπυλότητα της μεμβράνης κατά την εκβλάστηση του ιού.

Τέλος, η πρωτεΐνη E διαθέτει μία διαμεμβρανική περιοχή και για αυτό το λόγο δύναται να ολιγομεριστεί. Πράγματι, έχει αναφερθεί ότι η πρωτεΐνη E μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον εαυτό της, μέσω της διαμεμβρανικής της περιοχής, για να σχηματίσει ένα κανάλι ιόντων. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του C-άκρου των πρωτεϊνών E και M καθοδηγεί τη στρατολόγηση της πρωτεΐνης E στο σύμπλεγμα Golgi, ξεκινώντας την εκβλάστηση του ιού στα κύτταρα ξενιστές. Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί πως η πρωτεΐνη E μπορεί να αλληλεπιδράσει και με την νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη N.

Συνοψίζοντας, μολονότι ακόμα δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητή η λειτουργικότητα όλων των δομικών πρωτεϊνών του SARS-CoV-2, είναι βέβαιο πως είναι απαραίτητες για την δράση του ιού. [110], [115], [117], [118]

## SARS-CoV 2 Structure



**Εικόνα 105.** Απεικόνιση της προτεινόμενης δομής και των επιμέρους δομικών πρωτεϊνών του SARS-CoV-2, όπως έχει προκύψει από δομικές μελέτες. [119]

### 4.3.3 Μη-δομικές πρωτεΐνες

Εκτός από τις προαναφερθείσες δομικές πρωτεΐνες, υπάρχουν αρκετές μη δομικές πρωτεΐνες (Non-structural proteins, NSPs), οι οποίες αναφέρονται ως NSP1 έως NSP10 και NSP12 έως NSP16, που κωδικοποιούνται από γονίδια, που βρίσκονται εντός της περιοχής 5' του γονιδιώματος RNA. Οι μη δομικές πρωτεΐνες διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή και μεταγραφή του ιού, καθώς επίσης και στον τρόπο αλληλεπίδρασης αυτού με τον ξενιστή. Αναλυτικά τα χαρακτηριστικά της κάθε πρωτεΐνης, καθώς επίσης και ο ρόλος τους αναφέρονται παρακάτω.[112], [115], [120]

**NSP1:** Η Nsp-1 αποτελείται από 180 αμινοξέα και εμπλέκεται στην καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή, παρεμποδίζοντας την παραγωγή αντιικών πρωτεϊνών στα κύτταρα του ξενιστή. Εμποδίζει το κύτταρο-ξενιστή να ξεκινήσει την διαδικασία της μετάφρασης, δηλαδή την πρωτεϊνοσύνθεση και παρεμβαίνει στις οδούς σηματοδότησης του ανοσοποιητικού του ξενιστή. Αυτό επιτυγχάνεται είτε με σύνδεση της Nsp-1 στη ριβοσωμική υπομονάδα 40S και αναστολή της μετάφρασης του mRNA σε διαφορετικά στάδια, είτε με διάσπαση του ενδονουκλεολυτικού RNA του ξενιστή.

**NSP-2:** Η Nsp-2 αποτελείται από 638 αμινοξέα και βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με τις προχιμπιτίνες 1 και 2 (Prohibitins), οι οποίες κωδικοποιούνται από το γονίδιο *Phb* και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης, στις μιτοχονδριακές



λειτουργίες και στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η Nsp2, παρομοίως, με την Nsp1, μπορεί να συμβάλει στην ιική αντιγραφή, αναστέλλοντας τις φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου-ξενιστή.

NSP-3: Η Nsp-3 αποτελεί τη μεγαλύτερη μη δομική πρωτεΐνη του SARS-CoV-2 με μέγεθος 1945 αμινοξέα και διαθέτει πολλαπλές λειτουργικές περιοχές. Η Nsp3 περιλαμβάνει μία ή δύο περιοχές πρωτεάσης τύπου παπαΐνης, που είναι υπεύθυνες για τη διάσπαση αρκετών πρωτεϊνών Nsp, συμπεριλαμβανομένης της αυτοδιάσπασης της Nsp3. Η θέση διάσπασης και η εκλεκτικότητα στόχων, των πρωτεασών που μοιάζουν με παπαΐνη στην Nsp3, μπορεί να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των κορωνοϊών. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι ενώ η περιοχή 2 της πρωτεάσης υπάρχει σε όλους τους κορωνοϊούς, η παρουσία της περιοχής 1 διατηρείται μόνο σε ορισμένους ιούς. Στην περίπτωση αυτή ανήκει και ο SARS-CoV-2. Επιπλέον, η πρωτεάση, που μοιάζει με παπαΐνη διασπά τις αλυσίδες πολυουβικιτίνης, παρεμποδίζοντας την ανοσοφλεγμονώδη απόκριση του ξενιστή. Η Nsp3 διαθέτει δύο περιοχές που μοιάζουν με ουβικιτίνη, η μία βρίσκεται στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης και μπορεί να μεσολαβήσει στην αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη N και με το ssRNA, και η δεύτερη παίζει ρόλο στην αναστολή της παραγωγής ιντερφερονών, ενώ εμπλέκεται και στην έμφυτη ανοσολογική απόκριση. Τέλος, η Nsp3 διαθέτει επίσης μια περιοχή (macrodomain) που εμπλέκεται στην αναστολή της έκφρασης των γονιδίων της έμφυτης ανοσίας του ξενιστή. Εκτός από αυτούς τους ρόλους, η Nsp3 είναι επίσης υπεύθυνη για την έναρξη της συναρμολόγησης του συμπλέγματος αντιγραφής-μεταγραφής σε κύτταρα του SARS-CoV-2. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι αλληλεπιδρά με μια σειρά από άλλες πρωτεΐνες του ιού, συμπεριλαμβανομένων των Nsp2, Nsp4, Nsp6, Orf3a, Orf7a και Orf9b, υπογραμμίζοντας τον κεντρικό ρόλο της στον κύκλο ζωής του ιού. Συγκεκριμένα, οι Nsp3, Nsp4 και Nsp6 έχουν αποδειχθεί ότι σχηματίζουν ένα σύμπλοκο, που τροποποιεί το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) σε κυστίδια διπλής μεμβράνης (double membrane vesicles, DMVs). Συνοψίζοντας, η Nsp3 παίζει κεντρικό ρόλο στην αντιγραφή του ιού, και ως εκ τούτου είναι ένας ελκυστικός στόχος για την ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων. [112], [115], [118], [121]

NSP-4: Η Nsp-4 έχει μέγεθος 500 αμινοξέων και είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, που μπορεί να συμβάλει στην αναδιάταξη των κυτταρικών μεμβρανών και των μεμβρανών του ενδοπλασματικού δικτύου, για να σχηματιστούν τα οργανίδια αντιγραφής του ιού. Εικάζεται ότι η Nsp4 βοηθά στην αγκύρωση του συμπλέγματος αντιγραφής-μεταγραφής του ιού, σε συνδυασμό με άλλες, ενσωματωμένες στη μεμβράνη, ικές πρωτεΐνες, όπως οι Nsp3 και Nsp6. Επίσης, συμμετέχει στην επαγωγή της αυτοφαγίας των κυττάρων του ξενιστή, γεγονός το οποίο παρέχει τους απαραίτητους πόρους για την αντιγραφή του ιού.

NSP-5: Η Nsp-5 γνωστή και ως MPro (Main Protease) είναι μια βασική πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από 306 αμινοξέα. Μαζί με την περιοχή που μοιάζει με παπαΐνη της Nsp-3, είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση των πολυπεπτιδίων Orf1ab και την απελευθέρωση των ώριμων πρωτεϊνών Nsp. Ουσιαστικά, η Nsp-5 είναι ένα βασικό ένζυμο υπεύθυνο για την επεξεργασία και την ωρίμανση των ικών πολυπρωτεϊνών σε μεμονωμένες λειτουργικές πρωτεΐνες. Το γεγονός αυτό την καθιστά και έναν θεραπευτικό στόχο, καθώς η αναστολή της θα εμπόδιζε την παραγωγή πρωτεϊνών Nsp και κατ' επέκταση την αντιγραφή του ιού.

NSP-6: Η Nsp-6 είναι μια ενσωματωμένη μεμβρανική πρωτεΐνη, που βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, αποτελείται από 290 αμινοξέα και έχει ουσιαστικό ρόλο στον σχηματισμό των κυστιδίων διπλής μεμβράνης (DMVs), όπου λαμβάνει χώρα η αντιγραφή του ιού. Συμμετέχει στην αναδιάταξη των μεμβρανών του κυττάρου-ξενιστή για να δημιουργήσει ένα κατάλληλο περιβάλλον για την αναπαραγωγή του ιού.

NSP-7 και NSP-8: Η Nsp-7 αποτελείται από 83 αμινοξέα και σχηματίζει ένα σύμπλοκο με την Nsp-8, η οποία αποτελείται από 198 αμινοξέα και ουσιαστικά είναι μια RNA πολυμεράση. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες δρουν ως συμπράγοντες για την ενεργοποίηση της δράσης της ιικής, εξαρτώμενης από RNA, RNA πολυμεράσης (RdRp, RNA-dependent RNA polymerase), η οποία είναι απαραίτητη για την αντιγραφή και την μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος.

NSP-9: Η Nsp-9 είναι μια πρωτεΐνη, αποτελούμενη από 198 αμινοξέα, δεσμεύεται στο RNA και πιστεύεται ότι εμπλέκεται στη σύνθεση και αντιγραφή του ιικού RNA. Αλληλεπιδρά με άλλες ιικές πρωτεΐνες (π.χ. ελικάση) και παράγοντες του ξενιστή για να διευκολύνει την αποτελεσματική αντιγραφή.

NSP-10: Είναι μια πρωτεΐνη, 139 αμινοξέων, η οποία προσομοιάζει με αυξητικό παράγοντα, ο οποίος διαθέτει δύο μοτίβα δέσμευσης ψευδαργύρου. Ουσιαστικά, αποτελεί έναν συμπράγοντα της NSP-16 και φαίνεται να έχει συμμετοχή και στην διατήρηση της βέλτιστης λειτουργίας και άλλων ιικών μη δομικών πρωτεϊνών, όπως των Nsp-14, Nsp-15, Nsp-16. Επίσης, σύμπλεγμα αυτής της πρωτεΐνης με την Nsp-14 και την Nsp-16 διαδραματίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην κάλυψη και προστασία του ιικού RNA, ώστε να μην γίνει ανιχνεύσιμος στόχος από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή.

NSP-11: Είναι μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από 13 αμινοξέα, πανομοιότυπα με το πρώτο τμήμα της Nsp-12. Πληροφορίες για τον ρόλο της δεν υπάρχουν ακόμα διαθέσιμες.

NSP-12: Η Nsp-12 είναι μια εξαρτώμενη από RNA, RNA πολυμεράση, RdRp, η οποία περιέχει πολλές υπομονάδες. Δομικά αποτελείται από 932 αμινοξέα και περιέχει δύο κύριες λειτουργικές περιοχές, δηλαδή, το N-τελικό άκρο (1-379), που περιέχει μια περιοχή νουκλεοτιδυλοτρανσφεράσης και μία περιοχή με λειτουργία πολυμεράσης(398-919).

NSP-13: Η Nsp13 είναι μια πρωτεΐνη 67 kDa, 932 αμινοξέων, που ανήκει στην οικογένεια ελικάσης 1B και χρησιμοποιεί την ενέργεια της υδρόλυσης τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων καταλυτικά, για το ξετύλιγμα του δίκλωνου DNA ή RNA σε κατεύθυνση 5' προς 3'. Η Nsp13 έχει αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με την ιική, εξαρτώμενη από RNA, RNA πολυμεράση, Nsp12 και δρα σε συνδυασμό με το σύμπλεγμα αντιγραφής-μεταγραφής (Nsp7/Nsp8/Nsp12). Αυτή η αλληλεπίδραση έχει βρεθεί ότι διεγείρει σημαντικά τη δραστηριότητα ελικάσης της Nsp13. Εκτός από τη δραστηριότητα ελικάσης, η Nsp13 διαθέτει επίσης δράση RNA 5' τριφωσφατάσης εντός της ίδιας δραστηρικής θέσης, υποδηλώνοντας έναν περαιτέρω ουσιαστικό ρόλο της πρωτεΐνης αυτής στον σχηματισμό του ιικού καλύμματος mRNA 5'. Η Nsp13 περιέχει 5 περιοχές, μια N-τελική περιοχή δέσμευσης ψευδαργύρου (ZBD), στην οποία συμπλέκονται 3 ιόντα ψευδαργύρου, μια ελικοειδή περιοχή, μια περιοχή β-βαρελίου 1B και δύο υπο-περιοχές ελικάσης 1 A και 2 A, που περιέχουν τα αμινοξικά κατάλοιπα, που είναι υπεύθυνα για την νουκλεοτιδική δέσμευση και την υδρόλυση. [122]

NSP-14: Η Nsp-14 είναι ένα ένζυμο 60 kDa, 527 αμινοξέων, το οποίο εμφανίζει διττό ρόλο. Εμπλέκεται τόσο στην πιστότητα της αντιγραφής μέσω μιας N-τελικής περιοχής (Exoribonuclease domain, ExoN), όσο και στην κάλυψη του m-RNA (m-RNA capping), μέσω της καρβόξυ-τελικής N7-μεθυλτρανσφεράσης (N7-MTase). Επίσης, η Nsp-14 εμπλέκεται και σε άλλες διαδικασίες, όπως ο ανασυνδυασμός του ιικού γονιδιώματος και ο έλεγχος της εγγενούς ανοσολογικής απόκρισης. Η εξω-ριβονουκλεοτιδική δραστηριότητα της Nsp14 με κατεύθυνση 3'-5' βασίζεται σε μεταλλικά ιόντα και κυρίως  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  και είναι αυτή, η οποία αποτελεί εμπόδιο στην παραγωγή νουκλεοσιδικών αναλόγων κατά του SARS-CoV-2.



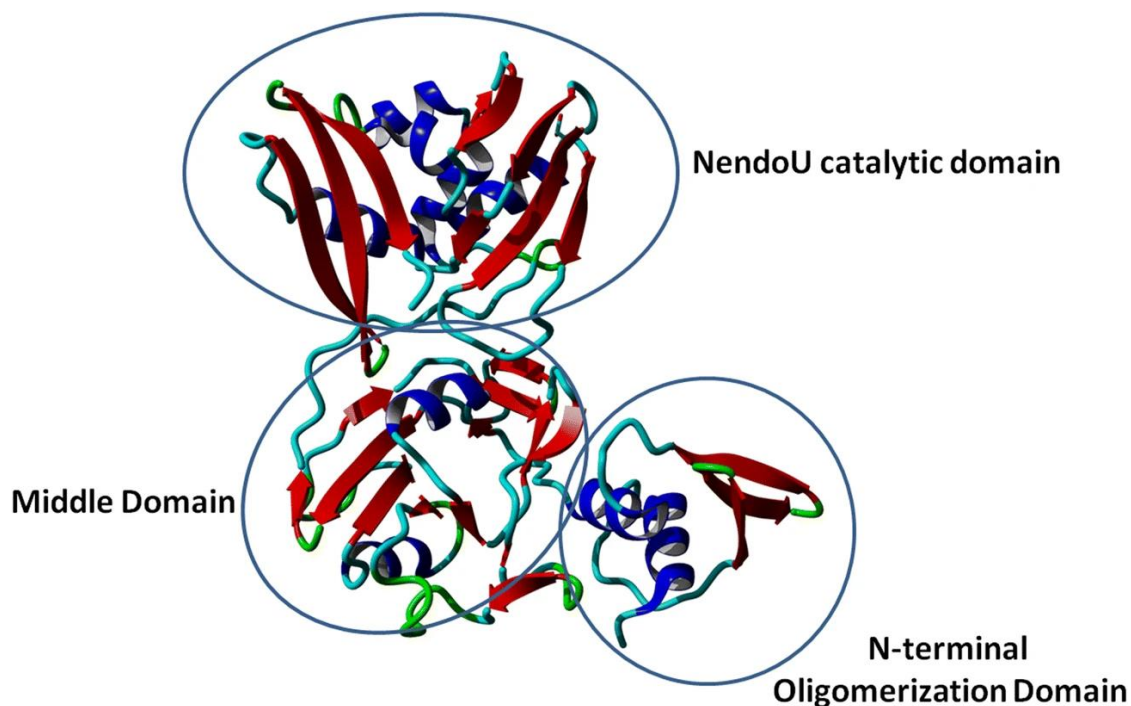
NSP-16: Η Nsp-16 αποτελείται από 298 αμινοξέα, και είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον κύκλο αντιγραφής του ιού, καθώς είναι απαραίτητη για την αποφυγή καταστολής του κορωνοϊού από το ανοσοποιητικό σύστημα. Η Nsp16 είναι μια 2'-Ο-Μεθυλοτρανσφεράση (2'-O-MTase), που αποτελεί μέρος του συμπλέγματος αντιγραφής-μεταγραφής. Συγκεκριμένα, η Nsp16 καταλύει τη μεταφορά μιας μεθυλικής ομάδας από τον συμπαράγοντά της, S-αδενοσυλ-μεθειονίνης (SAM), στο 2' υδροξύλιο του σακχάρου ριβόζης του mRNA του ιού. Αυτή η μεθυλίωση βελτιώνει την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης και συγκαλύπτει το mRNA, έτσι ώστε να μην αναγνωρίζεται από τους ενδοκυτταρικούς υποδοχείς αναγνώρισης παθογόνων. Είναι ενδιαφέρον ότι, ενώ όλες οι άλλες 2'-Ο-μεθυλοτρανσφεράσες είναι ενεργές ως μονομερή, η Nsp16 απαιτεί έναν συνεργατικό παράγοντα δέσμησης, την Nsp10, για να είναι ενεργή. [115], [123]

#### 4.3.4 Η μη δομική πρωτεΐνη NSP-15

Η Nsp-15, αποτελούμενη από 347 αμινοξέα, είναι μια ειδική για την ουριδίνη ενδοριβονουκλεάση (καλείται και EndoU (Endoribonuclease Poly(Uridine) specific)), που έχει ενοχοποιηθεί ότι συμμετέχει σε διαδικασίες αντιγραφής-μεταγραφής ιών. Η εν λόγω πρωτεΐνη βρίσκεται μόνο σε ιούς της τάξης Nidovirales. Λαμβάνοντας υπόψη ότι δεν υπάρχουν ομόλογα αυτής σε άλλους ιούς RNA, η Nsp15 θεωρείται γενετικός δείκτης αυτής της τάξης ιών.

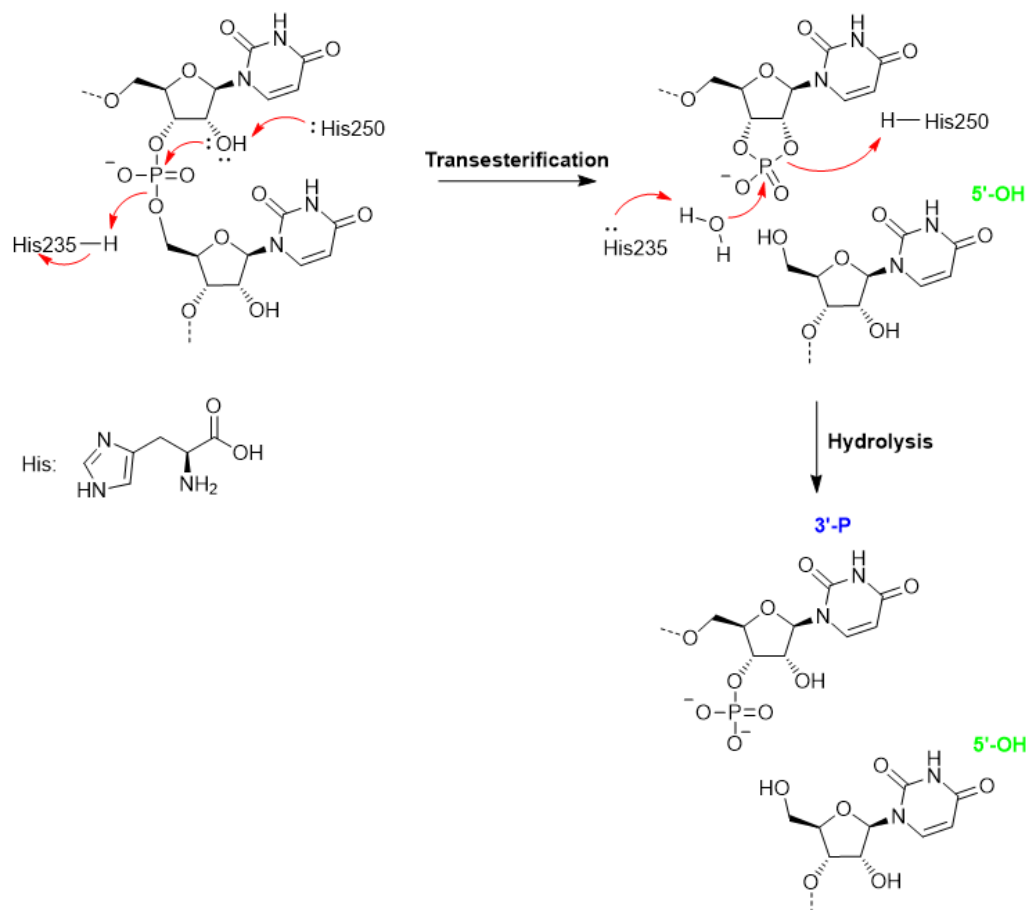
Αυτό το ένζυμο διασπά συγκεκριμένα υποστρώματα dsRNA, ενδονουκλεολυτικά στο 3' άκρο των πυριμιδινών, με προτίμηση στις βάσεις ουριδίνης, απελευθερώνοντας ένα κυκλικό προϊόν με 2'-3' φωσφοδιεστερικό δεσμό και 5'-υδροξυλικά άκρα. Η δραστηριότητα της Nsp15 μπορεί να επηρεαστεί από τη δευτεροταγή δομή του RNA και προτιμά τη διάσπαση μη ζευγαρωμένων βάσεων ουριδίνης. Έχει αναφερθεί επίσης ότι η παρουσία μεθυλικών ομάδων 2'-Ο-ριβόζης στο υπόστρωμα RNA μπορεί να εμποδίσει τη δραστηριότητα της Nsp15. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η Nsp16 καταλύει τη μεθυλίωση στο 2'-Ο-ριβόζης. Λαμβάνοντας αυτό υπόψη, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η Nsp16 μπορεί να είναι ένας ρυθμιστής της δραστηριότητας της Nsp15, ώστε να αποφευχθεί η διάσπαση σημαντικών μορίων ιικού RNA κατά τη διάρκεια της μόλυνσης. [117], [124]

Επιπρόσθετα, βιοχημικές αναλύσεις έδειξαν ότι η εν λόγω πρωτεΐνη απαιτεί δισθενή ιόντα ως συμπαράγοντα, για να πραγματοποιήσει τη διάσπαση του RNA, με έντονη προτίμηση για  $Mn^{2+}$ . Δομικές μελέτες με Nsp15 από διαφορετικούς κορωνοϊούς αποκάλυψαν, ότι αυτή η πρωτεΐνη είναι ένα εξαμερές, που σχηματίζεται από διμερή τριμερών, με μια χαρακτηριστική αναδίπλωση σε σχέση με άλλες ριβονουκλεάσες. Κάθε μονομερές αποτελείται από τρεις χαρακτηριστικές περιοχές, την άμινο-τελική περιοχή (N-terminal domain, ND, αμινοξέα 1-64), που είναι σημαντική για τον ολιγομερισμό, την μεσαία περιοχή (Middle domain, MD, αμινοξέα 65-182) και την καρβόξυ-τελική καταλυτική EndoU περιοχή (C-terminal catalytic EndoU domain, αμινοξέα 207-347). Οι άμινο-τελικές περιοχές είναι ευθυγραμμισμένες προς το κέντρο του εξαμερούς, ενώ οι EndoU είναι στραμμένες προς την επιφάνεια, γεγονός που υποδηλώνει πως η Nsp-15 διαθέτει έξι ενεργές περιοχές. Κάθε ενεργή περιοχή σε κάθε μονομερές βρίσκεται κοντά στη διεπιφάνεια με μία EndoU περιοχή, γεγονός που μπορεί να υπονοεί έναν πιθανό μηχανισμό αλλοστερικής επικοινωνίας μεταξύ των μονομερών της Nsp-15.



**Εικόνα 106.** Κρυσταλλική δομή του μονομερούς της πρωτεΐνης Nsp-15 (PDB-ID: 6VWW).[125]

Η Nsp-15 διαθέτει αρκετά διατηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα (His235, His250, Lys290, Thr341, Trp333, Tyr343, Ser294, Gly248, Lys345, Val295 και Gln245) (αρίθμηση σύμφωνα με SARS-CoV-2 PDB 6VWW), τα οποία είναι ζωτικής σημασίας και σχετίζονται με την εκλεκτικότητα που εμφανίζει η πρωτεΐνη για συγκεκριμένα υποστρώματα, καθώς επίσης εμπλέκονται και στην δραστικότητα και τον ολιγομερισμό του ενζύμου. Η καταλυτική περιοχή της Nsp-15, η οποία είναι ανάλογη με αυτήν της RNAase A, αποτελείται από μία τριάδα αμινοξέων, δύο ιστιδίνες His235 και His250 και από μία λυσίνη Lys290, τα οποία είναι απαραίτητα για την καταλυτική δραστικότητα του ενζύμου και χρησιμοποιούν τον οξεοβασικό καταλυτικό μηχανισμό για την ολοκλήρωση της διάσπασης. Ο μηχανισμός με τον οποίο γίνεται η διάσπαση περιγράφεται παρακάτω. Η μία ιστιδίνη λειτουργεί ως βάση για να ενεργοποιήσει το 2'OH, ενώ η άλλη ιστιδίνη λειτουργεί ως οξύ για να δώσει ένα πρωτόνιο στο 5'OH που αποχωρεί. Κατά τη διάρκεια του δεύτερου σταδίου υδρόλυσης, οι ρόλοι των δύο υπολειμμάτων ιστιδίνης της ενεργού θέσης αντιστρέφονται. Τα τρία καταλυτικά υπολείμματα H235, H250 και K290 συγκεντρώνονται γύρω από το σάκχαρο ριβόζης της μονοφωσφορικής ουριδίνης, UMP (Uridine Monophosphate). Τα αμινοξέα H250 και K290 βρίσκονται και τα δύο σε απόσταση δεσμού υδρογόνου από το 2'OH της ριβόζης. Αυτή η διάταξη της ενεργού θέσης υποδηλώνει ότι, η H250 λειτουργεί ως βάση για την ενεργοποίηση του 2'OH για πυρηνόφιλη προσβολή, ενώ η K290 σταθεροποιεί την αποπρωτονίωση του O2'. Αντίθετα, η H235 βρίσκεται πιο πίσω από τη ριβόζη και βρίσκεται σε απόσταση δεσμού υδρογόνου από το φωσφορικό ιόν στην ενεργή θέση. Με βάση τη διάταξη της ενεργού θέσης, η H235 είναι σωστά ευθυγραμμισμένη για να παίξει τον ρόλο του οξέος κατά την αντίδραση μετεστεροποίησης. [118], [120], [126], [127], [128], [129], [130], [131], [132], [133]



**Εικόνα 107.** Μηχανισμός διάσπασης της ουριδίνης από τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας της *Nsp-15*.

Εκτός των αμινοξέων της καταλυτικής τριάδας, υπάρχουν και άλλα αμινοξέα που φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για τη δράση του ενζύμου. Για παράδειγμα, πρόσφατες μελέτες της δομής της πρόσδεσης της *Nsp-15* σε ανάλογα ουριδίνης έδειξε, πως τα αμινοξέα Ser294 και Tyr343 αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα και προσδίδουν ουσιαστικά αυτήν την εξειδίκευση για ουριδίνη. Συγκεκριμένα, βρέθηκε πως η σερίνη σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με την ουρακίλη (2 δεσμούς με το 2-O και με το 3-N), ενώ η τυροσίνη αναπτύσσει αλληλεπιδράσεις Van der Waals (π-π αλληλεπιδράσεις) με το σάκχαρο της ριβόζης της ουριδίνης. Επιπλέον, άλλα αμινοξέα που φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο είναι, η Asn278, η οποία συνεισφέρει στην τοποθέτηση της σερίνης στην κατάλληλη θέση για να μπορεί να αλληλεπιδράσει με την ουρακίλη, η Thr341, που συμμετέχει στην αναγνώριση του υποστρώματος και η Leu346, η οποία σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το 4-O της ουρακίλης και έχει παρόμοια δράση με τη θρεονίνη. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως οι θέσεις, τόσο της ουρακίλης, όσο και της ριβόζης διαφέρουν πριν και μετά την πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης και τη διάσπαση. Αποτέλεσμα αυτού, είναι ότι η Trp333 σχηματίζει π-π αλληλεπιδράσεις με την ουρακίλη, αλλά η Ser294 πλέον σταματά να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με αυτήν, λόγω της αλλαγής στη διαμόρφωση.

Όσον αφορά τη λειτουργία της πρωτεΐνης στον κύκλο ζωής του ιού, αρχικά υπήρχε η θεώρηση πως αυτή εμπλέκεται στις διαδικασίες αντιγραφής του ιού. Αργότερα, βρέθηκε πως η λειτουργία της *Nsp-15* δεν είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιού, ωστόσο είναι κρίσιμης σημασίας για την αποφυγή της αναγνώρισης από το ανοσοποιητικό σύστημα του

ξενιστή. Αυτό επιτυγχάνεται, καθώς η Nsp-15 διασπά τις αλληλουχίες του αρνητικού κλώνου RNA, που περιέχουν πολλές βάσεις ουρακίλης, οι οποίες βρέθηκε ότι ενεργοποιούν τον υποδοχέα MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated Protein 5), που σχετίζεται με το παθογόνο μοριακό πρότυπο (PAMP, Pathogen Associated Molecular Pattern). Αυτός ο υποδοχέας ουσιαστικά αναγνωρίζει ιούς και ταυτόχρονα μεσολαβεί στην απόκριση ιντερφερόνης. Συνεπώς, αν μειωθεί η κυτταρική συσσώρευση πολύ-ουριδινικών αλληλουχιών, λόγω της δράσης της Nsp-15, ο ιός θα γίνει πιο δύσκολα ανιχνεύσιμος από το ανοσοποιητικό του ξενιστή. [128], [133], [134]

Συνοψίζοντας, από όσα προαναφέρθηκαν συνειδητοποιούμε ότι η πρωτεΐνη Nsp-15 αποτελεί έναν αρκετά ενδιαφέρον φαρμακευτικό στόχο για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων κατά του SARS-CoV-2.

#### 4.3.5 Βοηθητικές πρωτεΐνες

Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα ORF (Open Reading Frames) ή τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης αναφέρονται σε συγκεκριμένες περιοχές εντός του ιικού γονιδιώματος που σχετίζονται με την κωδικοποίηση πρωτεϊνών. Κωδικοποιούν τις 4 δομικές πρωτεΐνες και τις 16 μη δομικές πρωτεΐνες του ιού. Αποτελείται από το ORF1a και ORF1b. Αυτά τα δύο επικαλυπτόμενα ORF στο 5' άκρο του ιικού γονιδιώματος είναι κρίσιμα για την παραγωγή δύο μεγάλων πολυπρωτεϊνών, των pp1a και pp1ab. Αυτές οι πολυπρωτεΐνες επεξεργάζονται στη συνέχεια από ικές πρωτεάσες για να δώσουν μια σειρά από μη δομικές πρωτεΐνες (NSPs)). [135]

Εκτός όμως από αυτές, υφίστανται και κάποιες βοηθητικές πρωτεΐνες. Ο SARS-CoV-2 κωδικοποιεί εννέα βοηθητικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των ORF3a (275 αμινοξέα), ORF3b (22 αμινοξέα), ORF6 (61 αμινοξέα), ORF7a (121 αμινοξέα), ORF7b (43 αμινοξέα), ORF8 (121 αμινοξέα), ORF9b (97 αμινοξέα), ORF9c και ORF10 (38 αμινοξέα), οι οποίες παράγονται από τουλάχιστον 5 ORFs (Open Reading Frames), που κωδικοποιούν βοηθητικά γονίδια. Αυτές οι βοηθητικές πρωτεΐνες έχουν ουσιαστικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις ιού-ξενιστή, επηρεάζοντας την έμφυτη ανοσία του ξενιστή, την αυτοφαγία και την απόπτωση, καθώς επίσης τον πολλαπλασιασμό και τη λοιμογόνο δράση του ιού.

ORF3a: Αυτή η πρωτεΐνη είναι η μεγαλύτερη σε έκταση βοηθητική πρωτεΐνη του ιού με 274 αμινοξέα, μεταφρασμένα από το ORF3a, το οποίο βρίσκεται στο γονιδίωμα μεταξύ των γονιδίων των S και E. Αυτές οι βοηθητικές πρωτεΐνες μπορούν να ενεργοποιηθούν, μέσω της οδού σηματοδότησης της ιντερφερόνης (IFN) και να απελευθερώσουν προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε αλλαγές στο περιβάλλον του μολυσμένου κυττάρου και να προκαλέσουν φλεγμονή, οδηγώντας πιθανώς στα πιο θανατηφόρα συμπτώματα του COVID-19. Η ORF3a βοηθά επίσης τον ιό να διαφύγει, δημιουργώντας μια οπή στη μεμβράνη του μολυσμένου κυττάρου. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί πως μπορεί να αυξήσει την έκφραση και την έκκριση ινωδογόνου, αλλά επίσης να έχει συμμετοχή και στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Τέλος, μία από τις σημαντικότερες δράσεις αυτής της πρωτεΐνης σχετίζεται με την ικανότητα του ιού να στοχεύει εκλεκτικά τα μιτοχόνδρια, στα οποία επιτίθεται και τα καταστρέφει, στερώντας από τα κύτταρα την ικανότητα να καταπολεμούν τη λοίμωξη μέσω της αυτοφαγίας. [135][136]

ORF3b: Η ORF3b συσσωρεύεται στον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια των μολυσμένων κυττάρων. Αυτή η πρωτεΐνη αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων στη φάση G0/G1. Επιπλέον, η απόπτωση και η νέκρωση προκαλούνται από την υπερέκφραση αυτής της πρωτεΐνης. Τέλος, αυτή η πρωτεΐνη επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα του

ξενιστή αντιδρά στη μόλυνση από τον ιό, αναστέλλοντας την παραγωγή ιντερφερονών (IFN), που αποτελούν βασικό συστατικό της ανοσολογικής απόκρισης. [136]

ORF6: Αποτελεί μια αρκετά μικρή πρωτεΐνη με μοριακό βάρος περίπου 7 kDa, που βρίσκεται στο σύμπλεγμα Golgi και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Αυτή η πρωτεΐνη εμπλέκεται στη μείωση της σύνθεσης της πρωτογενούς IFN και της σηματοδότησής της.

ORF7a: Αυτή η διαμεμβρανική πρωτεΐνη 121 αμινοξέων, εμφανίζεται να κατέχει περισσότερες από μία δράσεις. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί πως σχετίζεται με την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, καθώς επίσης και με σημαντικές λειτουργίες, οι οποίες μπορεί να επηρεάζονται από τη λοίμωξη, όπως η πήξη του αίματος ή η επιβίωση κυττάρων ζωτικής σημασίας. Ειδικότερα, έχει βρεθεί πως βοηθά τον ιό να δραπετεύει από τα μολυσμένα κύτταρα του ξενιστή, ή ακόμα αλληλεπιδρά με παράγοντες, που είναι απαραίτητοι για την πήξη του αίματος και τη σωστή λειτουργία των πνευμόνων. Επιπλέον, συνδέεται με κύτταρα του ανοσοποιητικού και προκαλεί σημαντικές φλεγμονώδεις αντιδράσεις στο περιφερικό αίμα του ασθενούς.

ORF7b: Αυτή η πρωτεΐνη διαφέρει από άλλες πρωτεΐνες του SARS CoV-2, επειδή στερείται της ίδιας αλληλουχίας. Η διαμεμβρανική περιοχή της ORF7b είναι απαραίτητη για την παραμονή αυτής της πρωτεΐνης στο σύμπλεγμα Golgi. Η δράση της παραμένει ακόμα άγνωστη.

ORF8a και ORF8b: Η ORF8 είναι μια βοηθητική πρωτεΐνη του SARS-CoV-2, η οποία αποτελείται από ένα N-τελικό σηματοδοτικό πεπτίδιο (αμινοξέα 1-17), που εξυπηρετεί τη μεταφορά στο ενδοπλασματικό δίκτυο, και μια περιοχή που προσομοιάζει με την ανοσοσφαιρίνη (αμινοξέα 18-121). Η πρωτεΐνη ORF8a, κατέχει βασικό ρόλο στην εισαγωγή πρωτεϊνών στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου. Αλληλεπιδρά με μια ποικιλία πρωτεϊνών των κυττάρων του ξενιστή, που εμπλέκονται στο μονοπάτι αποδόμησης, που σχετίζεται με το ενδοπλασματικό δίκτυο. Επιπρόσθετα, τα κύτταρα, που εκφράζουν την ORF8a παράγουν λιγότερες ποσότητες MHC-I (κάνουν ορατά πεπτιδικά θραύσματα πρωτεϊνών του εσωτερικού του κυττάρου στα κυτταροτοξικά CD8<sup>+</sup> T κύτταρα και πυροδοτούν την ανοσολογική απόκριση). Τέλος, η πρωτεΐνη ORF8a έχει επίσης αποδειχθεί ότι σχηματίζει ενδοκυτταρικά συσσωματώματα στα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα και συμβάλλει στο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, γεγονός το οποίο οδηγεί στην αποφυγή της ανοσολογικής απόκρισης. Όσον αφορά την ORF8b που μοιάζει με ανοσοσφαιρίνη, αυτή κυρίως εμπλέκεται στη μείωση της ανοσολογικής απόκρισης, αλλά συγχρόνως υπάρχουν αναφορές ότι σχετίζεται με διεργασίες όπως η αυτοφαγία και η αποικοδόμηση πρωτεϊνών.

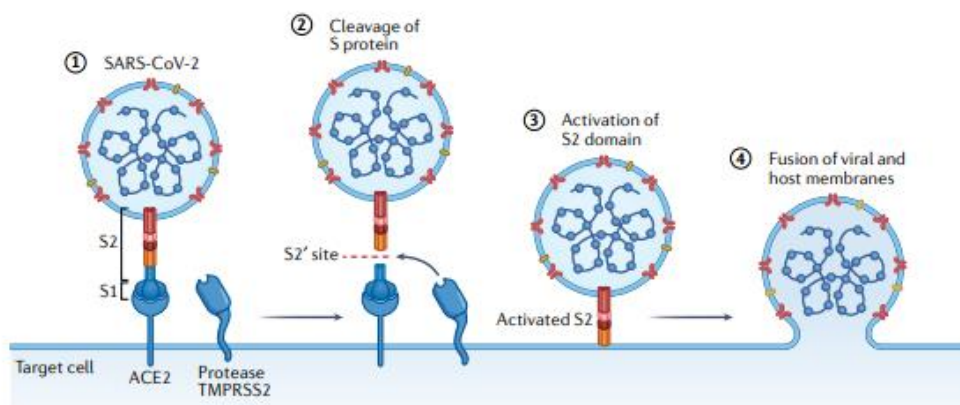
ORF10: Αυτή η πρωτεΐνη έχει ένα χαρακτηριστικό μοριακής αναγνώρισης, μια περιοχή 3 έως 7 αμινοξέα, η οποία χρησιμεύει ως θέση μοριακής αναγνώρισης για αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες. Αυτό είναι ένα κρίσιμο χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών, που έχουν λανθασμένη αναδίπλωση και τους επιτρέπει να προσαρμοστούν και να αλληλεπιδρούν με πολλές άλλες πρωτεΐνες. [137][138]

#### 4.4 Μηχανισμός μόλυνσης-Κύκλος ζωής του ιού

Παρόμοια με άλλους ιούς, οι κορωνοϊοί χρησιμοποιούν τα κύτταρα άλλων οργανισμών για να επιβιώσουν και να αναπαραχθούν. Τα στάδια αντιγραφής και πολλαπλασιασμού του κορωνοϊού περιλαμβάνουν τη δέσμευση και την είσοδο στο κύτταρο ξενιστή, τη μετάφραση της ιικής ρεπλικάσης, τη μεταγραφή του γονιδιώματος, την αντιγραφή, τη μετάφραση δομικών πρωτεϊνών και τη διάταξη και απελευθέρωση του ιού.

### Προσάρτηση στην επιφάνεια του κυττάρου-ξενιστή και είσοδος στο κύτταρο

Η δέσμευση ξεκινά με την προσκόλληση του ιού στην κυτταρική επιφάνεια, μέσω της σύνδεσης της πρωτεϊνικής ακίδας σε έναν υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας. Η πρωτεϊνική ακίδα αποτελείται από δύο υπομονάδες, S1 και S2, με την S1 στο N-τελικό άκρο να παρέχει τη λειτουργία δέσμευσης στον υποδοχέα και την S2 στο C-τελικό άκρο να παρέχει τη δραστηριότητα σύντηξης, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 108**. Η διάσπαση των υπομονάδων S1/S2 στον κορωνοϊό προκαλείται από μία ή περισσότερες πρωτεάσες του ξενιστή. Η περιοχή δέσμευσης του υποδοχέα (RBD) της πρωτεϊνικής ακίδας είναι υπεύθυνη για την είσοδο των κορωνοϊών στα κύτταρα-ξενιστές. Ο SARS-CoV-2, μέσω της περιοχής δέσμευσης του υποδοχέα (RBD) της υπομονάδας S1 της ακίδας, δεσμεύει τον υποδοχέα ACE2 (ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης 2) του κυττάρου-ξενιστή. Αν και οι περιοχές δέσμευσης του SARS-CoV και του SARS-CoV-2 είναι παρόμοιες σε αλληλουχίες αμινοξέων, η μοριακή μοντελοποίηση αποκάλυψε ότι η RBD του SARS-CoV-2 έχει ισχυρότερη αλληλεπίδραση με το ACE2. Το ACE2 εκφράζεται κυρίως από τα επιθηλιακά κύτταρα των πνευμόνων και του λεπτού εντέρου, καθώς και από τους νεφρούς, την καρδιά και άλλους ιστούς. Μετά τη δέσμευση της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 στην πρωτεΐνη ACE2 του ξενιστή, η πρωτεϊνική ακίδα υφίσταται διάσπαση από πρωτεάση στη θέση διάσπασης S1/S2 και στη θέση S'2, η οποία βρίσκεται δίπλα σε ένα πεπτιδίο σύντηξης εντός της υπομονάδας S2. Η θέση S1/S2 υποβάλλεται επίσης σε διάσπαση από άλλες πρωτεάσες, όπως η διαμεμβρανική πρωτεάση σερίνης 2, (transmembrane protease serine 2, TMPRSS2) και η L-καθεψίνη. Η επακόλουθη διάσπαση στη θέση S'2 πιθανώς πυροδοτεί τη σύντηξη της μεμβράνης, μέσω μη αναστρέψιμων, διαμορφωτικών αλλαγών και έτσι διευκολύνει την πρόσβαση στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή και την απελευθέρωση του νουκλεοκαψιδίου σε αυτό. [112], [113], [139]



**Εικόνα 108.** Μηχανισμός πρόσδεσης του SARS-CoV-2 στην επιφάνεια του κυττάρου-ξενιστή. Η πρωτεΐνη S συνδέεται με τον υποδοχέα ACE2 στο κύτταρο ξενιστή χρησιμοποιώντας την περιοχή S1 (στάδιο 1). Αυτό επιτρέπει στην TMPRSS2 να διασπάσει την πρωτεΐνη S (στάδιο 2), οδηγώντας σε ενεργοποίηση της περιοχής S2 για σύντηξη (στάδιο 3). Η ενεργοποιημένη περιοχή S2 συγχωνεύει διπλές στοιβάδες ιού και λιπιδίου του ξενιστή, οδηγώντας σε εναπόθεση του γονιδιώματος θετικού-μονόκλωνου RNA του ιού στο κύτταρο-ξενιστή (στάδιο 4). [108]

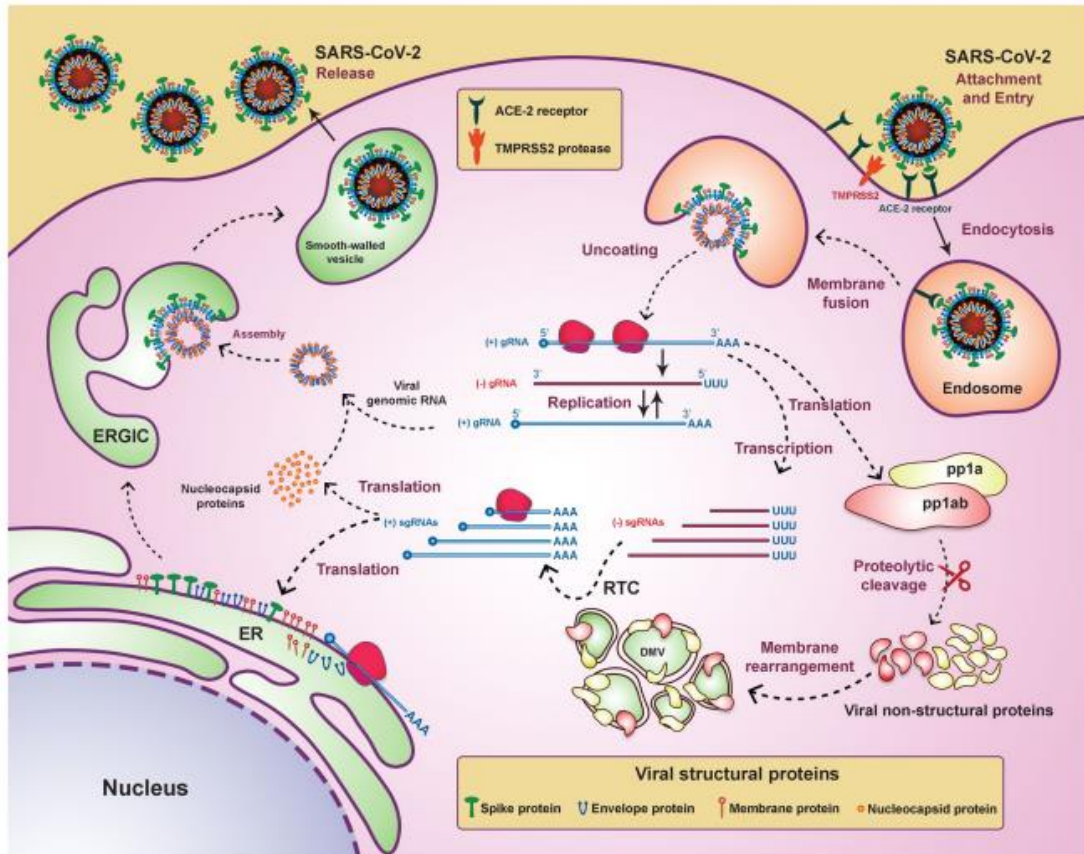
### *Μεταγραφή του ιού-Σχηματισμός συμπλόκου αντιγραφής-μεταγραφής (RTC)*

Μετά την είσοδο του ιού στο κύτταρο ξενιστή και την απελευθέρωση του ιικού νουκλεοκαψιδίου, το γονιδίωμα RNA του ιού δρα ως μεταγραφικό αντίγραφο και οδηγεί στη μετάφραση των ORF1a και ORF1b από το 5'-άκρο του καλυμμένου ιικού γονιδιώματος. Έπειτα, ακολουθεί η μετάφραση των PP1a και PP1b. Αυτές οι δύο πολυπρωτεΐνες υφίστανται αυτοπρωτεολυτική επεξεργασία αποδίδοντας τις 16 μη δομικές πρωτεΐνες (NSPs), οι οποίες σχηματίζουν το σύμπλοκο αντιγραφής-μεταγραφής (Replication-transcription complex, RTC) για τη σύνθεση ιικού RNA. Το RTC είναι ένα κρίσιμο συστατικό του μηχανισμού αναπαραγωγής ιών. Είναι ένα σύμπλεγμα πολλαπλών υπομονάδων, που περιλαμβάνει διάφορους παράγοντες του ιού και του ξενιστή. Το RTC είναι υπεύθυνο για την αντιγραφή του γονιδιώματος του ιικού RNA. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει τη σύνθεση ενδιάμεσων αρνητικών κλώνων RNA. Αυτοί χρησιμοποιούνται στη συνέχεια ως πρότυπα εκμαγεία για την παραγωγή ενός νέου γονιδιώματος RNA θετικών κλώνων. Αξίζει να αναφερθεί πως το ιικό RNA θετικών κλώνων είναι παρόμοιο με το mRNA και επομένως μπορεί να μεταφραστεί αμέσως από το κύτταρο-ξενιστή. Το ιικό RNA αρνητικών κλώνων είναι συμπληρωματικό του mRNA και επομένως πρέπει να μετατραπεί σε RNA θετικών κλώνων, από μια RNA πολυμεράση, πριν από τη μετάφραση. Εκτός από την αντιγραφή, το RTC εμπλέκεται στη μεταγραφή υπογονιδιωματικών μορίων RNA (subgenomic RNA, sgRNA). Τα υπογονιδιωματικά RNA παράγονται μέσω μιας ασυνεχούς διαδικασίας μεταγραφής. Κατά τη διάρκεια της μεταγραφής το σύνολο αρνητικών κλώνων υπογονιδιωματικού RNA (sgRNA) χρησιμοποιούνται ως πρότυπο για τη δημιουργία ενός συνόλου θετικών κλώνων sgRNA. Οι θετικοί κλώνοι sgRNA συσχετίζονται με το ριβόσωμα του ξενιστή, συνθέτοντας διάφορες δομικές και βοηθητικές πρωτεΐνες. Οι περισσότερες δομικές πρωτεΐνες του ιού υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη λειτουργία τους.

### *Σχηματισμός των σωματιδίων του ιού και απελευθέρωση του*

Οι περισσότερες από τις δομικές και βοηθητικές πρωτεΐνες, που σχετίζονται με τη μεμβράνη, όπως οι S, M και E συντίθενται από ριβοσώματα, τα οποία είναι συνδεδεμένα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ άλλες ιικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεΐνης N, μεταφράζονται στο κυτταρόσολιο από ριβοσώματα των κυττάρων-ξενιστών. Επιπλέον, αυτές οι δομικές πρωτεΐνες υφίστανται μετα-μεταφραστική τροποποίηση, η οποία ρυθμίζει τις λειτουργίες τους. Η συναρμολόγηση του ιού συγκλίνει σε μία θέση μεταξύ του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου και του συμπλέγματος Golgi (Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment, ERGIC). Το ERGIC αποτελεί μια συστάδα μεμβρανών και βοηθά στη μεταφορά μεταξύ των δύο αυτών οργανιδίων του κυττάρου. Εκεί η πρωτεΐνη M λειτουργεί ως πρότυπο και καθοδηγεί τη μορφογένεση του ιού, μέσω ετεροτυπικής αλληλεπίδρασης με τις υπόλοιπες δομικές πρωτεΐνες. Εν τέλει, τα σωματίδια του ιού, που συγκεντρώνονται στο ενδιάμεσο διαμέρισμα ER-Golgi (ERGIC), προσδένονται σε κυστίδια και μεταφέρονται με την εξωκύττωση μέσω της εκκριτικής οδού.



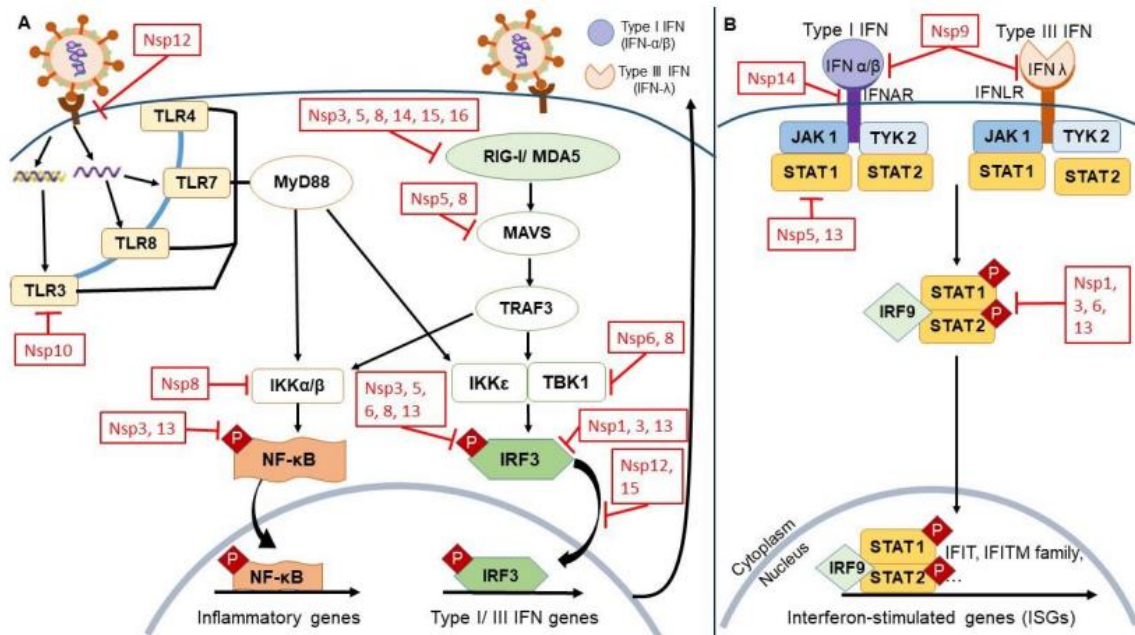


**Εικόνα 109.** Ο κύκλος ζωής του SARS-CoV-2 στο κύτταρο ξενιστή. [113]

**Απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή**

Τα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα αναγνωρίζουν τον SARS-CoV-2 ως παθογόνο, μέσω υποδοχών αναγνώρισης προτύπων (PRRs), και εκκρίνουν μόρια για να στρατολογήσουν κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Πρώτα, ανταποκρίνονται μακροφάγα, τα οποία φέρουν προφλεγμονώδη TLR2, 4, 6, (Toll-like Receptor 2, 4, 6), IL-1R (Interleukin 1 Receptor), IFN $\gamma$ -R (Interferon- $\gamma$  Receptor) και TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor), καθώς και άλλους υποδοχείς, οι οποίοι κατέχουν ρυθμιστικό ρόλο στην ανοσοποιητική απόκριση. Έπειτα, ακολουθεί η παρουσίαση του αντιγόνου, η οποία είναι μια ζωτικής σημασίας διαδικασία για την ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης των T κυττάρων, και περιλαμβάνει την έκφραση μορίων αντιγόνου στην επιφάνεια ενός μακροφάγου ή άλλου αντιγονο-παρουσιαστικού κυττάρου σε συνδυασμό με μόρια MHC τάξης II (major histocompatibility complex) όταν το αντιγόνο παρουσιάζεται σε ένα CD4+ βοηθητικό T κύτταρο ή σε συνδυασμό με μόρια MHC τάξης I όταν παρουσιάζεται σε CD8+ κυτταροτοξικά T κύτταρα. Εκτός από αυτά, υπάρχουν και ενδοκυτταρικοί αισθητήρες, όπως οι TLR7/8 και RIG-I/ MDA-5, οι οποίοι σηματοδοτούν την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων, IRF3/7 και NF- $\kappa$ B, καθώς επίσης και την παραγωγή ιντερφερονών τύπου I (IFNs) και φλεγμονωδών κυτοκινών. Βέβαια, ο ιός για να καταφέρει να αναπτυχθεί πρέπει να αποφύγει με κάποιον τρόπο αυτήν την διαδικασία, γεγονός που όπως προαναφέρθηκε επιτυγχάνεται κυρίως με τη δράση διαφόρων μη δομικών και βοηθητικών πρωτεϊνών, όπως παρουσιάζεται αναλυτικότερα και στην **Εικόνα 110**. [140]





**Εικόνα 110.** Αναπαράσταση της επίδρασης των μη-δομικών πρωτεϊνών στην αποφυγή του ιού από το ανοσοποιητικό σύστημα, τόσο στις πορείες αναγνώρισης, από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, μοτίβων που σχετίζονται με παθογόνα (σχήμα A), όσο και στις πορείες έκκρισης ιντερφερονών (σχήμα B). [79]

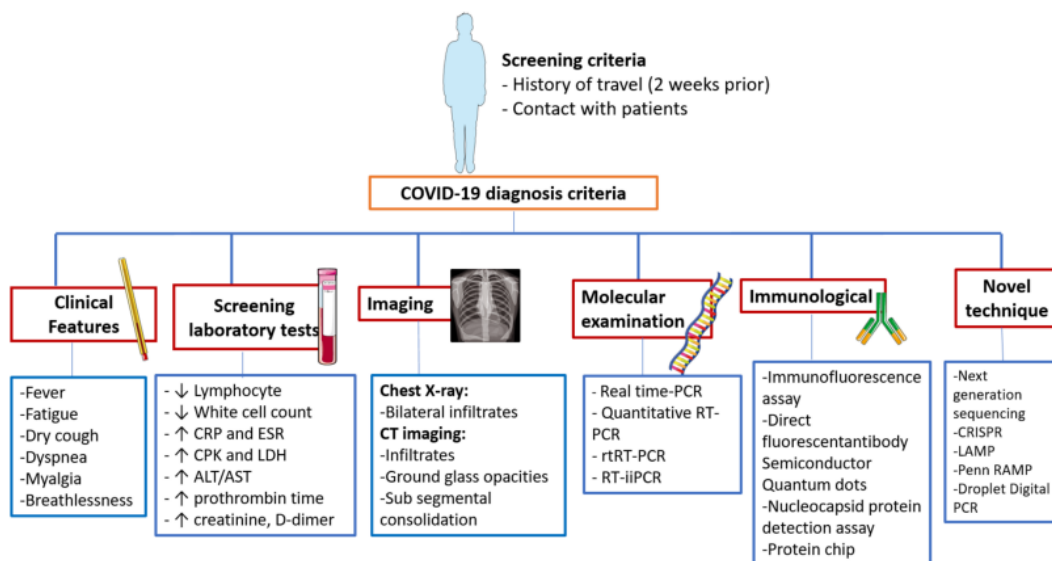
#### 4.5 Διάγνωση και θεραπεία του SARS-CoV-2

Παράλληλα με την τεράστια εξάπλωση του ιού αυξήθηκε η πίεση των συστημάτων υγείας να συνδράμουν στην περίθαλψη των ασθενών. Λαμβάνοντας επίσης υπόψη, πως αρκετοί ασθενείς νοσούν, χωρίς την εμφάνιση συμπτωμάτων, αλλά συμβάλλουν στην περαιτέρω διάδοση του ιού, αναδύθηκε η ανάγκη γρήγορης, υψηλής ακρίβειας και χαμηλού κόστους, διάγνωσης των ασθενών. Έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι διάγνωσης του ιού, οι οποίες αναφέρονται παρακάτω.

A) Ορολογικές εξετάσεις: Σε αυτές λαμβάνεται γενετικό δείγμα από τον ασθενή και γίνεται μέτρηση εάν διαθέτει ή όχι αντισώματα έναντι ενός ιού. Αυτή η δοκιμή, ωστόσο, δεν ενδείκνυται για να προσδιορίσει εάν ο ασθενής έχει τη νόσο αυτή τη στιγμή, αλλά αντ' αυτού, μετρά εάν ένα άτομο έχει αντισώματα για μια ασθένεια, κάτι που θα έδειχνε ότι έχει αναπτύξει μια ανοσολογική απόκριση έναντι του παθογόνου στο παρελθόν.

B) Ανίχνευση με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης-αντίστροφης μεταγραφής RT-PCR (Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction): Γίνεται συλλογή των δειγμάτων και ακολουθεί η απομόνωση του RNA. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η παραγωγή ενός μονόκλωνου συμπληρωματικού DNA (cDNA), το οποίο είναι αντίγραφο του RNA. Τέλος, πραγματοποιείται PCR για την ενίσχυση του cDNA και ανάλυση.

Γ) Ακτινολογικός έλεγχος: Η διάγνωση του ιού μπορεί να γίνει με εξαιρετικά μεγάλη ακρίβεια με ακτινολογική απεικόνιση με χρήση υπολογιστικής τομογραφίας (αξονική τομογραφία) των πνευμόνων των ασθενών. [109], [113], [114], [139]



**Εικόνα 111.** Διαγνωστικά πρωτόκολλα, που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της πανδημίας της COVID-19. [139]

Όσο αφορά τις θεραπευτικές προσεγγίσεις έναντι του SARS-CoV-2, αυτές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο κύριες κατηγορίες, τα φαρμακευτικά σκευάσματα και τα εμβόλια.

A) Αντικατάσταση φάρμακα: Η επαναχρησιμοποίηση αντιικών φαρμάκων, που είναι εγκεκριμένα από τον FDA για άλλες ιογενείς λοιμώξεις, είναι μια δημοφιλής προσέγγιση για την ανάπτυξη θεραπείας. Τα φάρμακα αυτά μπορεί να επιδρούν σε διάφορα στάδια του κύκλου ζωής του ιού.

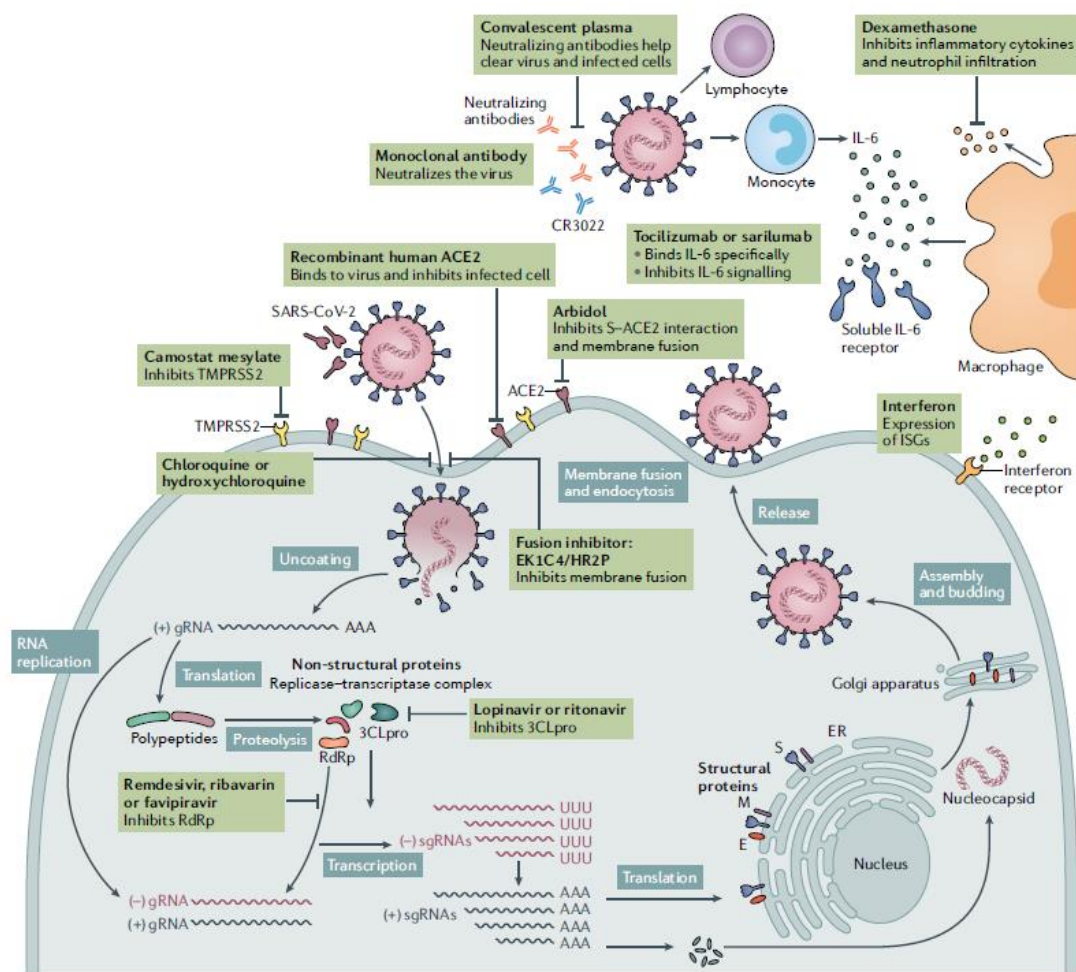
i) Αναστολή της εισόδου του ιού: Το Umifenovir (Arbidol) είναι ένα φάρμακο εγκεκριμένο στη Ρωσία και την Κίνα για τη θεραπεία της γρίπης και άλλων ιογενών λοιμώξεων του αναπνευστικού. Μπορεί να στοχεύσει την αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης S και του ACE2 και να αναστείλει τη σύντηξη της μεμβράνης. Θεωρείται σχετικά αποτελεσματικό φάρμακο εναντίον του ιού, ιδίως όταν συνδυάζεται με φάρμακα που δρουν ως αναστολείς πρωτεασών. Επιπρόσθετα, η χλωροκίνη και η υδροξυχλωροκίνη είναι πιθανά αλλά αμφιλεγόμενα φάρμακα, που παρεμβαίνουν στην είσοδο του SARS-CoV-2 στο κύτταρο-ξενιστή. Έχουν χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη και τη θεραπεία της ελονοσίας και των αυτοάνοσων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του συστηματικού ερυθματώδους λύκου και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Μπορούν να αναστείλουν τη γλυκοζυλίωση των κυτταρικών υποδοχέων και να παρεμβαίνουν στη δέσμευση ιού-υποδοχέα ξενιστή, καθώς και να αυξήσουν το ενδοσωμικό pH και να αναστείλουν τη σύντηξη της μεμβράνης. Ωστόσο, ο FDA έχει προειδοποιήσει για τη χρήση χλωροκίνης/υδροξυχλωροκίνης, λόγω των σοβαρών κινδύνων αρρυθμίας σε ασθενείς με COVID-19 και ιστορικό υπέρτασης, καρδιακής ανεπάρκειας και χρόνιων νεφρικών παθήσεων. Τέλος, το Camostat mesylate, φάρμακο εγκεκριμένο στην Ιαπωνία για τη θεραπεία της παγκρεατίτιδας και της μετεγχειρητικής οισοφαγίτιδας από παλινδρόμηση, μπορεί να αποτρέψει την είσοδο του SARS-CoV στα κύτταρα εμποδίζοντας τη δραστηριότητα του TMPRSS2.

ii) Αναστολή της αντιγραφής του ιού: Τα φάρμακα που μπλοκάρουν την αντιγραφή του ιού συνήθως είναι αναστολείς της RNA πολυμεράσης ή άλλων σημαντικών πρωτεασών. Οι αναστολείς αυτοί περιλαμβάνουν, Ρεμτεσιβίρη (GS-5734), φαβιλαβίρη (Favilavir, T-705), ριμπαβίρη (Ribavirin), λοπιναβίρη (Lopinavir) και ριτοναβίρη (Ritonavir). Εκτός από τη

λοπιναβίρη και τη ριτοναβίρη, που αναστέλλουν την πρωτεάση 3CLpro, τα άλλα τρία στοχεύουν στην RdRp. Το Remdesivir, το οποίο αρχικά αναπτύχθηκε για την καταπολέμηση λοιμώξεων από τον Έμπολα, ήταν το πρώτο αντιικό φάρμακο, που εγκρίθηκε από τον FDA για τη θεραπεία του COVID-19, στις 22 Οκτωβρίου 2020. Τερματίζει τη σύνθεση RNA και αναστέλλει την αναπαραγωγή του γονιδιώματος SARS-CoV-2. Επιπλέον, το Faviravir, ένα ανάλογο της γουανίνης, αναστέλλει την RNA πολυμεράση και χρησιμοποιείται επί του παρόντος για τη θεραπεία της γρίπης. Ένας συνδυασμός faviravir και ιντερφερόνης-α έδειξε δράση κατά του SARS-CoV. Επιπρόσθετα, η λοπιναβίρη (LPV) και η ριτοναβίρη (RTV) είναι εγκεκριμένοι αναστολείς πρωτεάσης για τη θεραπεία της λοίμωξης HIV-1. Το LPV και το RTV αρχικά υποτέθηκε ότι αναστέλλουν την πρωτεάση που μοιάζει με 3-χυμοθρυψίνη του SARS-CoV και του MERS-CoV, υπονοώντας την πιθανή χρήση τους για τη θεραπεία της COVID-19.

iii) Αντιφλεγμονώδεις παράγοντες: Αρκετά ανοσοτροποποιητικά φάρμακα, που ρυθμίζουν τη φλεγμονή δοκιμάζονται για την αποτελεσματικότητά τους έναντι του SARS-CoV-2. Η υπερβολική έκκριση κυτοκινών είναι ένας κρίσιμος καθοριστικός παράγοντας της θνησιμότητας σε ασθενείς με σοβαρά συμπτώματα στο τελευταίο στάδιο του COVID-19. Η IL-6 είναι μια βασική φλεγμονώδη κυτοκίνη, η οποία είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε σοβαρά άρρωστους ασθενείς με COVID-19 και η οδός σηματοδότησης του υποδοχέα IL6/IL-6 (IL-6R) είναι ένας πολλά υποσχόμενος στόχος για την ανακούφιση των φλεγμονωδών συμπτωμάτων. Το Tocilizumab και το Sarilumab, αντισώματα κατά του υποδοχέα της IL-6, εγκεκριμένα για χρήση στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, αποδείχθηκε ότι είναι αποτελεσματικά έναντι του συνδρόμου απελευθέρωσης κυτοκινών. Συνδέονται τόσο με τους υποδοχείς της μεμβράνης, όσο και με τους διαλυτούς υποδοχείς IL-6, καταστέλλοντας τη σηματοδοτική οδό JAK-STAT και ρυθμίζοντας αρνητικά την έκκριση των φλεγμονωδών μορίων. Επιπλέον, το Baricitinib αναστέλλει τις δραστηριότητες των κινασών JAK1 και JAK2 και μειώνει αποτελεσματικά τη μόλυνση από τον ιό SARS-CoV-2 και το rituxolitinib, ένας άλλος αναστολέας JAK1 και JAK2, έχει δείξει κάποια αποτελεσματικότητα στη μείωση της σοβαρής αναπνευστικής δυσχέρειας. Τέλος, κλινικές δοκιμές έδειξαν ότι τα κορτικοστεροειδή φαίνεται να είναι ωφέλιμα για ασθενείς με COVID-19 σε κρίσιμη κατάσταση. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η δεξαμεθαζόνη, που διαθέτει αντιφλεγμονώδη δράση. [116], [140]

iv) Μονοκλωνικά αντισώματα και θεραπεία με πλάσμα: Ενώ τα αντισώματα υποδεικνύουν ότι ένα άτομο έχει αναπτύξει ανοσοαπόκριση στον ιό, δεν υπάρχουν στοιχεία που να δείχνουν πόσο καιρό το άτομο θα προστατεύεται από την επαναμόλυνση. Παρόλα αυτά η ανοσία που προκαλείται από εξουδετερωτικά αντισώματα (neutralizing antibodies), τα οποία μπλοκάρουν την πρωτεϊνική ακίδα του ιού και αποτρέπουν την προσκόλληση στους υποδοχείς του κυττάρου-ξενιστή, είναι κρίσιμη για την πρόληψη επαναλαμβανόμενων ιογενών λοιμώξεων. Αρκετά μονοκλωνικά και εξουδετερωτικά αντισώματα (bamlanivimab, casirivimab, imdevimab), που έχουν εγκριθεί από τον FDA, είναι ειδικά και αποτελεσματικά για τη στόχευση του ιού. [141], [142]



**Εικόνα 112.** Διαδικασία αντιγραφής του SARS-CoV-2 και πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι. Τα πιθανά αντιικά στοχεύουν στα διαφορετικά στάδια της αντιγραφής του SARS-CoV-2, που περιλαμβάνουν τη δέσμευση υποδοχέα, την είσοδο και τη σύντηξη έως και την αντιγραφή. Επιπλέον, τα φάρμακα με βάση την ανοσοσφαιρίνη και τα ανοσοτροποποιητικά φάρμακα εμφανίζουν επίσης πιθανή θεραπευτική δράση. [116]

Β) Εμβόλια εναντίον του SARS-CoV-2: Με την έξαρση της πανδημίας κρίθηκε απαραίτητη η ανάπτυξη εμβολίου έναντι του ιού, τόσο για την ατομική υγειονομική περίθαλψη, αλλά και για την επίτευξη ανοσίας της αγέλης, στην οποία τουλάχιστον το 70% του συνολικού πληθυσμού θα πρέπει να είναι εμβολιασμένο. Ο προληπτικός εμβολιασμός είναι ο ασφαλέστερος και πιο οικονομικός τρόπος για την πρόληψη της νόσου και αποφυγή του θανάτου. Έτσι, η επιστημονική κοινότητα στράφηκε προς αυτήν την κατεύθυνση. Τα εμβόλια κατά του COVID-19 διακρίνονται κυρίως σε τρεις μορφές, τα μοριακά, τα ειδικά και τα κυτταρικά εμβόλια, τα οποία όμως έχουν ως κοινό στόχο να διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα κατά του SARS-CoV-2 με τη δημιουργία κυτάρων μνήμης. Τα μοριακά εμβόλια χρησιμοποιούν ολόκληρες πρωτεΐνες, κατακερματισμένα πεπτίδια ή ολόκληρους ιούς και δημιουργούν ανοσολογική απόκριση με τη βοήθεια κυττάρων, τα οποία συμμετέχουν στην παρουσίαση ενός αντιγόνου. [89] Τελικό αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση CD4<sup>+</sup> ή CD8<sup>+</sup> T κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα η διάκριση μπορεί να γίνει και στα εξής:

i) mRNA εμβόλια: Αρκετά εμβόλια COVID-19, όπως τα εμβόλια Pfizer–BioNTech και Moderna, χρησιμοποιούν RNA για να διεγείρουν την ανοσολογική απόκριση. Όταν εισάγεται στον ανθρώπινο ιστό, το εμβόλιο περιέχει είτε αυτοαναπαραγόμενο RNA, είτε αγγελιοφόρο RNA (mRNA), τα οποία και τα δύο προκαλούν στα κύτταρα την έκφραση της πρωτεϊνικής ακίδας. Αυτό ουσιαστικά υποδεικνύει στο σώμα να αναγνωρίσει και να καταστρέψει το παθογόνο όταν θα μολυνθεί ξανά με αυτό. Η παράδοση του mRNA στα κύτταρα του ξενιστή επιτυγχάνεται με κατάλληλο εγκλωβισμό του σε νανοσωματίδια λιπιδίων, τα οποία προστατεύουν τους κλώνους του RNA και βοηθούν την απορρόφησή τους στα κύτταρα.

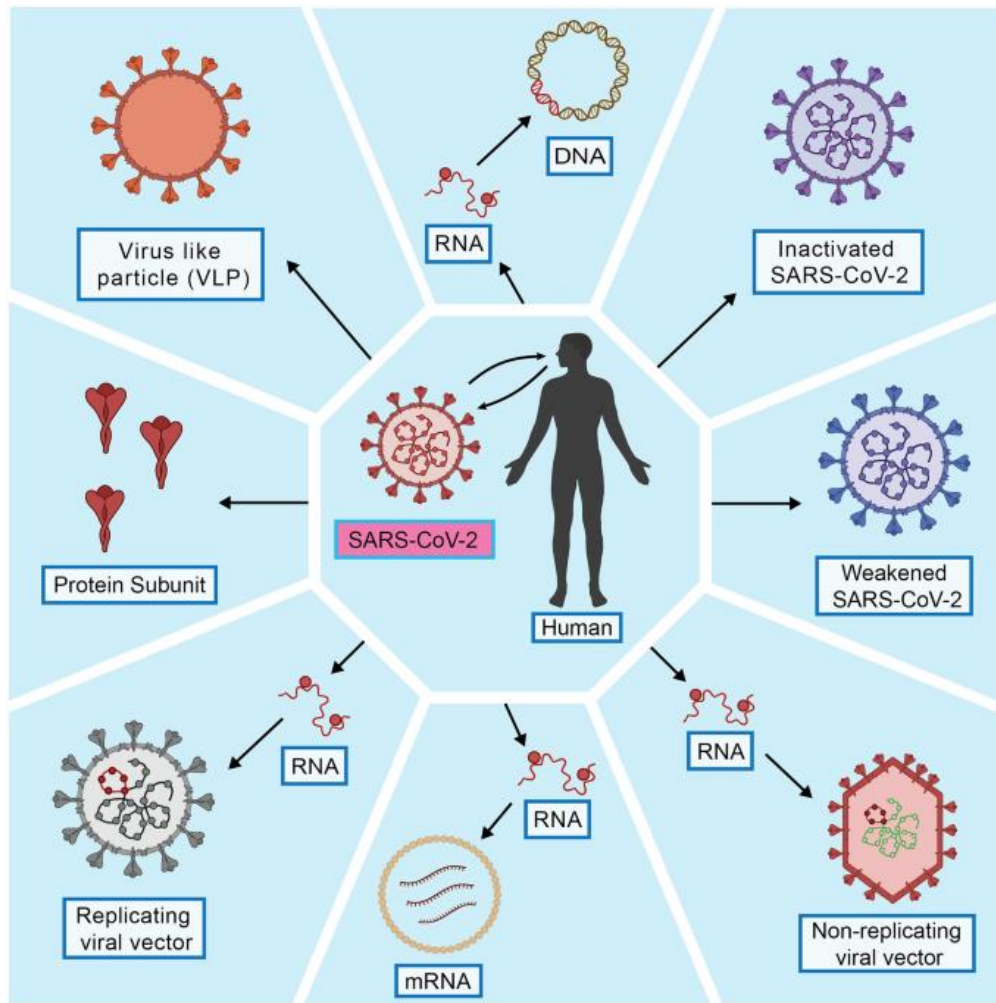
ii) Εμβόλια που φέρουν αδενοϊό: Ένα τέτοιο εμβόλιο χρησιμοποιεί έναν ιικό φορέα για την παροχή γενετικού υλικού (DNA), το οποίο μπορεί να μεταγραφεί από τα κύτταρα του ξενιστή ως mRNA, το οποίο με τη σειρά του κωδικοποιεί μια επιθυμητή πρωτεΐνη ή αντιγόνο, για να προκαλέσει την ανοσολογική απόκριση. Τα εμβόλια, που βασίζονται σε ιικό φορέα, δεν αντιγράφονται, πράγμα που σημαίνει ότι δεν παράγουν νέα σωματίδια ιού, αλλά παράγουν μόνο το αντιγόνο, που πυροδοτεί την ανοσολογική απόκριση. Τα εγκεκριμένα εμβόλια αυτού του τύπου είναι το εμβόλιο Oxford–AstraZeneca, το εμβόλιο Sputnik V, Convidecia και το εμβόλιο Janssen (Johnson & Johnson).

iii) Αδρανοποιημένα εμβόλια: Ένα αδρανοποιημένο εμβόλιο είναι ένα εμβόλιο, που αποτελείται από σωματίδια ιού, τα οποία έχουν αναπτυχθεί σε καλλιέργεια και στη συνέχεια θανατώθηκαν για να καταστρέψουν την ικανότητα αναπαραγωγής της ασθένειας. Παρόλα που δεν μπορούν να διαιρεθούν, τα σωματίδια του ιού διατηρούν μέρος της ακεραιότητάς τους, ώστε να αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα και να πυροδοτούν την ανοσολογική απόκριση.

iv) Εμβόλια, που φέρουν υπομονάδες πρωτεΐνης: Ένα τέτοιο εμβόλιο περιέχει μέρη του παθογόνου που είναι απαραίτητα για την πρόκληση ανοσοαπόκρισης. Το εμβόλιο υπομονάδας μπορεί να παρασκευαστεί από ανασυνδυασμένα ιικά σωματίδια σε κυτταρική καλλιέργεια ή έκφραση ανασυνδυασμένου DNA. Ένα εμβόλιο «υπομονάδας» δεν περιέχει ολόκληρο το παθογόνο, σε αντίθεση με το ζωντανό εξασθενημένο ή αδρανοποιημένο εμβόλιο, αλλά περιέχει μόνο μέρη όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες ή πεπτίδια. Επειδή το εμβόλιο δεν περιέχει «ζωντανά» συστατικά του ιού, δεν υπάρχει κίνδυνος εισαγωγής της νόσου και είναι ασφαλέστερο και πιο σταθερό από τα εμβόλια που περιέχουν ολόκληρα τα παθογόνα. [140], [142], [143], [144]

Συνοψίζοντας, τόσο τα διάφορα αντιικά φάρμακα, που έχουν χρησιμοποιηθεί και χρησιμοποιούνται έναντι του SARS-CoV-2, όσο επίσης και τα διάφορα εμβόλια, που έχουν αναπτυχθεί δεν έχουν προκαλέσει κορεσμό στην ανάγκη για ανάπτυξη νέων μεθόδων αντιμετώπισης της εξάπλωσης του ιού.





Εικόνα 113. Οι διάφορες τεχνικές ανάπτυξης εμβολίων έναντι του SARS-CoV-2. [144]

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

## Πειραματικό μέρος

### Υλικά και μέθοδοι

Όλα τα εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Οι οργανικοί πτητικοί διαλύτες απομακρύνθηκαν μέσω περιστροφικού εξατμιστήρα υπό κενό σε κατάλληλη θερμοκρασία. Οι μη πτητικοί διαλύτες απομακρύνθηκαν με λυοφιλοποίηση στα 0,1 mbar, 25°C. Για την απομόνωση των επιθυμητών προϊόντων, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με χρήση πυριτικής γέλης Acros Organics 60 (230-400 mesh) και υγρή χρωματπγραφία υψηλής απόδοσης. Ο έλεγχος της πορείας των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε με 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) στα 254 και 366 nm.

Για τη σύνθεση χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- Από την εταιρεία Sigma-Aldrich: Όλα τα παράγωγα της Ισατίνης (5-Br, 5-I, 5-F, 5-NO<sub>2</sub>, 5,5-DiBr), Ροδανίνη 98%, 3-αλλυλ-ροδανίνη 98%
- Από την εταιρεία Fluorochem: 4-(2-χλωροαιθυλ)(μεθυλ)αμινο)βενζαλδεΐδη 95%,
- Από την εταιρεία Carbosynth: 3,4-Διυδροξυ-5-Νιτροβενζαλδεΐδη 95%,
- Από την εταιρεία Alfa-Aesar: 4-N,N-διμεθυλαμινοκινναμάλδεΐδη, 5-ουρακίλη-καρβοξυαλδεΐδη, N-καρβοξυμεθυλο-ροδανίνη

### Φασματοσκοπία NMR

Τα φάσματα <sup>1</sup>H και <sup>13</sup>C πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ελήφθησαν σε φασματόμετρο Bruker Avance FT-NMR 250MHz, 400 MHz ή 500 MHz. Το πρόγραμμα Topspin 2.1 χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των φασμάτων. Στα φάσματα <sup>1</sup>H και <sup>13</sup>C, οι τιμές της χημικής μετατόπισης δίνονται σε ppm. Στην ανάλυση των φασμάτων, η πολλαπλότητα παρίσταται ως εξής: s απλή κορυφή, d διπλή κορυφή, dd διπλή διπλής κορυφή, ddd διπλή διπλής διπλή κορυφή, t τριπλή και m πολλαπλή κορυφή.

### Φασματοσκοπία UV-Vis

Τα φάσματα UV-Vis καταγράφηκαν με φασματοφωτόμετρο Edinburg D5S σε κυψελίδα χαλαζία 1 cm σε διάφορες θερμοκρασίες, ανάλογα το πείραμα. Για την λήψη των φασμάτων απορρόφησης χρησιμοποιήθηκε τυφλό δείγμα, που περιείχε τον εκάστοτε διαλύτη του πειράματος και έγινε μέτρηση της έντασης απορρόφησης συναρτήσει του μήκους κύματος από τα 250-900 nm.

### Φασματοσκοπία φθορισμού

Τα φάσματα φθορισμού καταγράφηκαν με φθορισμόμετρο Edinburg F5S σε κυψελίδα χαλαζία 1 cm, 3 ml, σε διάφορες θερμοκρασίες. Αρχικά έγινε λήψη ενός φάσματος εκπομπής με διέγερση στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης, που προέκυψε από τη φασματοσκοπία UV-Vis. Από το φάσμα εκπομπής προέκυψε ένα μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την λήψη του φάσματος διέγερσης. Τέλος, από το μέγιστο μήκος κύματος διέγερσης λήφθηκε το τελικό, διορθωμένο φάσμα φθορισμού.

### Ημιπαρασκευαστικοί και παρασκευαστικοί καθαρισμοί με RP-HPLC

Οι παρασκευαστικοί καθαρισμοί RP-HPLC πραγματοποιήθηκαν σε χρωματογράφο ThermoScientific Ultimate 3000 εξοπλισμένο με αντλία Dionex Ultimate 3000 και ανιχνευτή μήκους κύματος. Οι παρασκευαστικοί καθαρισμοί πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας μια στήλη Phenomenex Jupiter 10 μm Proteo 90Å C18 (250 × 21.2 mm) με ροή 20 mL min<sup>-1</sup>. Ο ανιχνευτής μήκους κύματος ήταν ρυθμισμένος στα 254 nm σε όλους τους καθαρισμούς.

#### Φασματομετρία Μάζης

Τα φάσματα μάζης λήφθηκαν σε φασματόμετρο μάζας Xevo G2 Q-TOF, όπου χρησιμοποιήθηκε σε λειτουργία θετικού ESI (Ιονισμός Ηλεκτροψεκασμού, ElectroSpray Ionization) για άμεση λήψη έγχυσης με χρήση πλήρους σάρωσης MS σε εύρος σάρωσης μάζας 50–1200 m/z. Τυπικές συνθήκες πηγής για τη μέγιστη ένταση των ιόντων ήταν οι εξής: τριχοειδής τάση 3,0 kV, δείγμα κώνου 40 V, θερμοκρασία πηγής 120 °C, θερμοκρασία αποδιάλυσης 550 °C, ταχύτητα ροής αερίου κώνου 100 L h<sup>-1</sup>, ταχύτητα ροής αερίου αποδιάλυσης (N<sub>2</sub>) 600 L h<sup>-1</sup>.

#### Σύνθεση υποβοηθούμενη από μικροκύματα

Για τη σύνθεση με μικροκύματα χρησιμοποιήθηκε ένα όργανο CEM 908005 Discover system Microwave synthesizer 300 W.

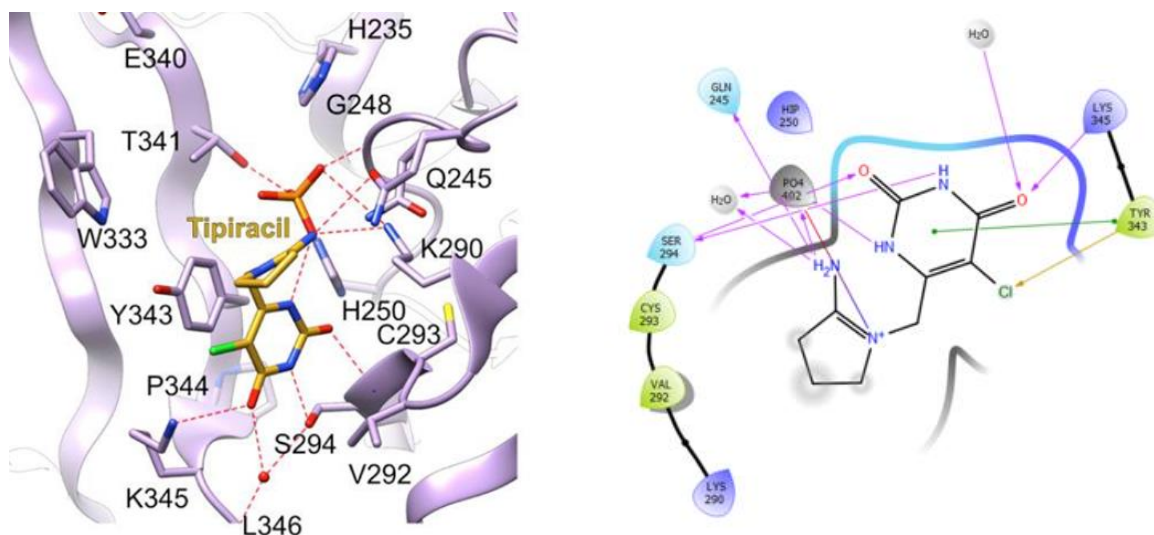
### **5.1 Σύνθεση και αξιολόγηση μικρών οργανικών μορίων, που βασίζονται στο μόριο της Ισατίνης και δρουν ως πιθανοί αναστολείς της NSP-15 του SARS-CoV-2**

#### **5.1.1 Ορθολογικός σχεδιασμός**

Όπως ήδη προαναφέρθηκε, η Nsp-15 αντιπροσωπεύει έναν πολύτιμο στόχο για την ανάπτυξη αντικών μικρών αναστολέων. Οι περισσότεροι αναστολείς της Nsp-15, που έχουν σχεδιαστεί και μελετηθεί μέχρι τώρα, δρουν αναστέλλοντας τη δέσμευση της ουρακίλης εντός της ενεργού θέσης. Άλλη μία εναλλακτική προσέγγιση είναι η αναστολή του εξαμερισμού της πρωτεΐνης, ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καταλυτική δράση. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε πως η Τιπιρακίλη, ένα φάρμακο εγκεκριμένο από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Φαρμάκων και Τροφίμων (FDA) για την θεραπεία έναντι του καρκίνου του παχέος εντέρου, μπορεί να αναστείλει την Nsp-15 του SARS-CoV-2, μέσω αλληλεπίδρασή της με την κοιλότητα πρόσδεσης ουριδίνης της καταλυτικής περιοχής του ενζύμου.[145] Επιπρόσθετα, έχουν διερευνηθεί οι δομικές λεπτομέρειες του τρόπου αλληλεπίδρασης της Τιπιρακίλης με την Nsp-15, όπως παρουσιάζεται και στην **Εικόνα 114**, οι οποίες προσφέρουν χρήσιμες πληροφορίες, που μπορούν να αξιοποιηθούν περαιτέρω για τον σχεδιασμό και την σύνθεση νέων μορίων με πιθανή ανασταλτική δράση. Σε αυτό το πλαίσιο εξετάσαμε το μόριο της Ισατίνης (Isatin) ως πιθανό αναστολέα της Nsp-15. Η Ισατίνη (1*H*-ινδόλη-2,3-διόνη) είναι ένα ετεροκυκλικό μόριο, που συναντάται τόσο στον άνθρωπο όσο και στα φυτά. Λόγω του ποικίλου φάσματος φαρμακολογικών δράσεων της έναντι του καρκίνου, μυκητιασικών λοιμώξεων, μικροβίων, φλεγμονών, HIV και άλλων, το μόριο της Ισατίνης και τα παράγωγά της έχουν διαμορφώσει μια σταθερή πλατφόρμα για την ανάπτυξη πολυάριθμων βιοδραστικών ενώσεων για την αντιμετώπιση διαφόρων, φαρμακολογικά σημαντικών, στόχων. Επιπρόσθετα, η Ισατίνη είναι μία καρβονυλική ένωση με αρκετά μεγάλη ευελιξία σε ένα σύνολο βασικών χημικών αντιδράσεων. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν η εισαγωγή υποκαταστατών στις θέσεις 5 και 7 του αρωματικού της δακτυλίου, οι αντιδράσεις N-ακυλίωσης και N-αλκυλίωσης, η αναγωγή του καρβονυλίου και η συμπύκνωση Knoevenagel σε αυτό. [146][147][148][149]

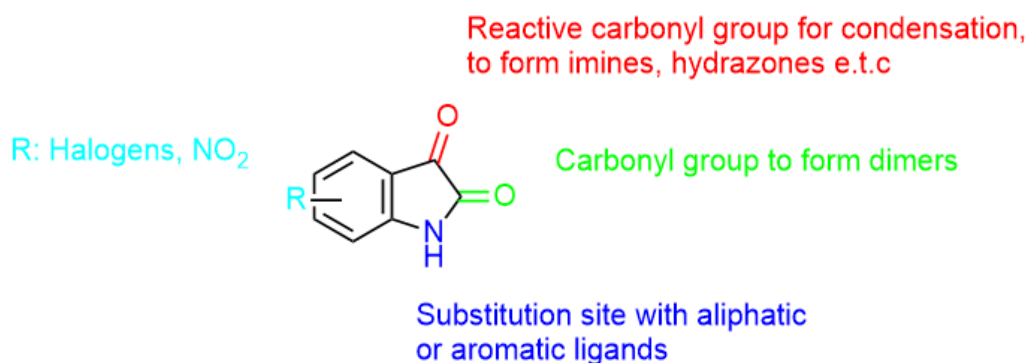


Έτσι, πραγματοποιήθηκαν μελέτες μοριακής μοντελοποίησης (*in silico*) για να εξακριβωθεί εάν η Ισατίνη και τα ανάλογά της εμφανίζουν παρόμοια αλληλεπίδραση με την Nsp-15, όπως η Τιπρακίλη. Αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι η Ισατίνη καταλαμβάνει ευνοϊκά τον ειδικό θύλακα δέσμευσης της Nsp-15. Για να ενισχύσουμε περαιτέρω τη συγγένεια δέσμευσης της πρωτεΐνης, προχωρήσαμε σε τροποποιήσεις της δομής της Ισατίνης και των παραγώγων της. Αυτές οι τροποποιήσεις περιλάμβαναν την προσθήκη νιτριλο-ομάδων στα αρχικά μόρια, μέσω αντιδράσεων συμπύκνωσης. Ο σχεδιασμός αυτός επιλέχθηκε, καθώς η νιτριλο-ομάδα είναι μια σημαντική λειτουργική ομάδα, που απαντάται ευρέως σε διάφορους φαρμακολογικούς παράγοντες. Πρέπει να παρατηρήσουμε ότι δεκάδες φάρμακα εγκεκριμένα από τον FDA περιέχουν αυτή τη λειτουργική ομάδα. Αυτή η ομάδα φέρει έναν *sp* άνθρακα συνδεδεμένο με τριπλό δεσμό με ένα άτομο αζώτου, το οποίο διαθέτει ένα μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων. Αυτό το ζεύγος συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου και σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με αμινοξέα (τόσο με τη βασικό κορμό όσο και με την πλευρική αλυσίδα). Μερικά από τα πλεονεκτήματα που προσφέρει, σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, και για το λόγο αυτό, επιλέξαμε να την ενσωματώσουμε στα ανάλογα μας, είναι οι βελτιωμένες φαρμακοκινητικές ιδιότητες, που μπορεί να προσφέρει στα νέα μόρια, η μεταβολική σταθερότητα, η μη κυτταροτοξικότητα και οι ενισχυμένες αλληλεπιδράσεις με πρωτεϊνικούς στόχους, κυρίως λόγω ανάπτυξης δεσμών υδρογόνου. [150][151] Συγκεκριμένα, όσον αφορά την περίπτωση του SARS-CoV-2, έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι η Ρεμτεσιβίρη (Remdesivir), ένα μικρό νουκλεοσιδικό ανάλογο, είναι αποτελεσματικό στη θεραπεία του COVID-19. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η νιτριλο-ομάδα έπαιξε κρίσιμο ρόλο στην δράση της Ρεμτεσιβίρης σε σύγκριση με άλλα φαρμακοφόρα ανάλογα. Όλα αυτά τα ευρήματα μας οδήγησαν στην ανάπτυξη μιας νέας γενιάς πιθανών αναστολέων της Nsp-15, που έχουν ενσωματωμένη την νιτριλο-ομάδα, και στις *in-silico* μελέτες αυτών των αναλόγων.



**Εικόνα 114.** Διαγραμματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων του μορίου της Τιπρακίλης με τα αμινοξέα στο ενεργό κέντρο της Nsp-15 (PDB ID: 6WXC). Το μόριο της Τιπρακίλης δεσμεύεται στη θέση ουρακίλης, όπως παρατηρείται στα 5'UMP και 5'GrU. Ο δακτύλιος της ουρακίλης σχηματίζει π-π αλληλεπιδράσεις με την Tyr341 και αναπτύσσει δεσμούς υδρογόνου με τη Ser294 (αλληλεπιδρώντας με O2 και N3), τη Lys345 (O4) και την His250. Η καρβονυλική ομάδα της Leu346 δημιουργεί έναν δεσμό υδρογόνου μέσω μορίου νερού στη δομή με την Τιπρακίλη. Το άτομο αζώτου N1 της Τιπρακίλης δημιουργεί δεσμό υδρογόνου μ' ένα φωσφορικό ιόν και μέσω αυτού συνδέεται με την Lys290. Υπάρχουν επίσης

δύο αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται με μόριο νερού από τα αμινοξέα Ser294 και το άτομο οξυγόνου του καρβονυλίου της κύριας αλυσίδας της Val292. Το άτομο αζώτου ιμινοπυρρολιδίνης αλληλεπιδρά με τη Gln245. Η Nsp15 δεσμεύει την Τιπρακίλη στην καταλυτική της κοιλότητα με τρόπο συμβατό με ανταγωνιστική αναστολή και η ένωση και τα παράγωγά της μπορεί να χρησιμεύσουν ως αναστολείς του ενζύμου. Αυτή η δομή υποδηλώνει ότι η ουρακίλη από μόνη της μπορεί να παρουσιάζει παρόμοιες ανασταλτικές ιδιότητες και παρέχει τη βάση για την ανάπτυξη φαρμάκου με βάση τον σκελετό της ουρακίλης. [152]



**Εικόνα 115.** Το μόριο της Ισατίνης και οι διάφορες χαρακτηριστικές ομάδες που διαθέτει, στις οποίες μπορεί να γίνουν κατάλληλες χημικές τροποποιήσεις.

### 5.1.2 Πειράματα Μοριακής Μοντελοποίησης

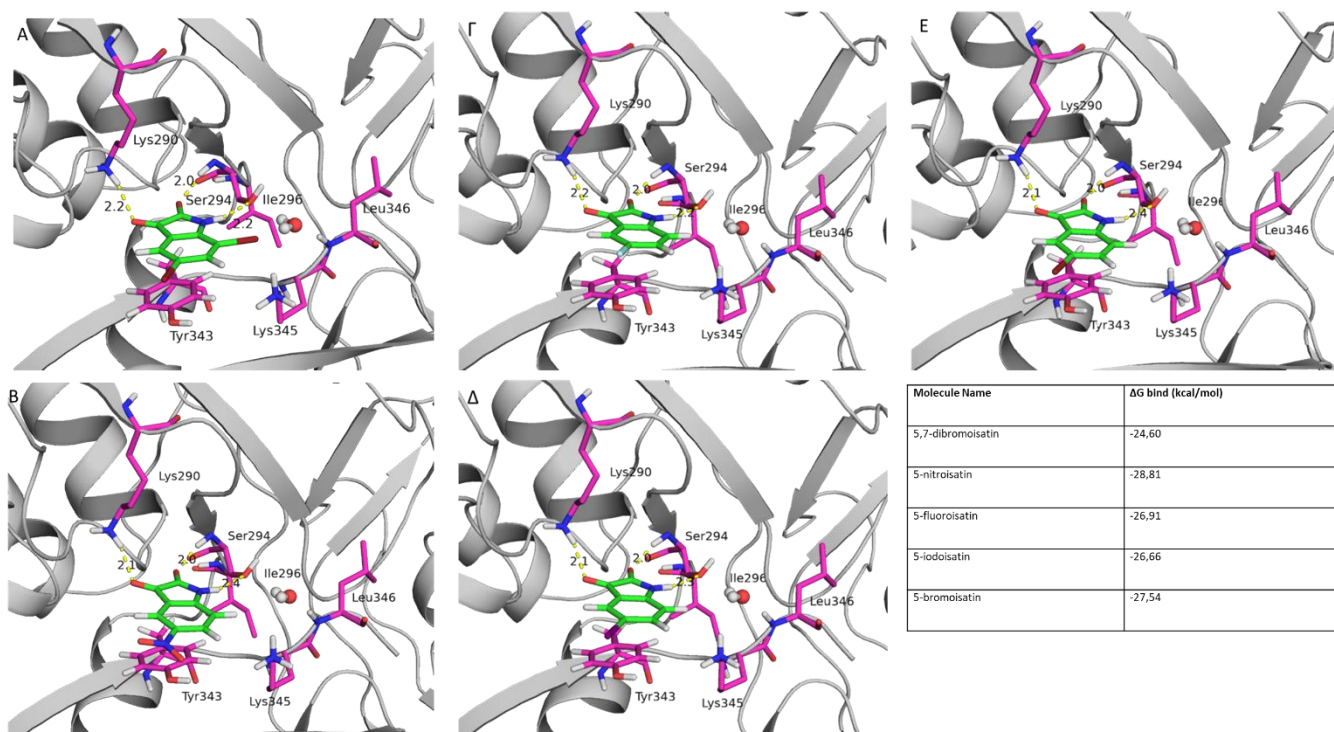
Η Μοριακή Μοντελοποίηση είναι μια υπολογιστική τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται στο πεδίο της υπολογιστικής χημείας και της δομικής βιολογίας για την πρόβλεψη του προτιμώμενου προσανατολισμού και της συγγένειας δέσμευσης ενός μικρού μορίου (συνδέτη, ligand) σε ένα μόριο υποδοχέα, ο οποίος συνήθως είναι μια πρωτεΐνη. Τα πειράματα Μοριακής Μοντελοποίησης είναι ιδιαίτερα χρήσιμα εργαλεία στην κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ βιομορίων ή ακόμα και στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων. Η διαδικασία της πρόσδεσης περιλαμβάνει δύο κύρια στάδια: α) την πρόβλεψη της διαμόρφωσης του συνδέτη, καθώς επίσης της θέσης και του προσανατολισμού του εντός της περιοχής δέσμευσης (αυτό καλείται ως "πόζα") και β) τον υπολογισμό της συγγένειας και ικανότητας πρόσδεσης (binding affinity). Τα προγράμματα σύνδεσης χρησιμοποιούν διάφορους αλγόριθμους για να εξερευνήσουν τις πιθανές διαμορφώσεις δέσμευσης και τους προσανατολισμούς του συνδέτη εντός της ενεργής θέσης του υποδοχέα. Εν τέλει, χρησιμοποιείται μία συνάρτηση, ώστε να γίνει αξιολόγηση και κατάταξη των διαφορετικών διαμορφώσεων (poses), που μπορεί να υιοθετήσει ο συνδέτης κατά την πρόσδεση στον υποδοχέα, και από αυτή τη συνάρτηση υπολογίζεται μία τιμή (binding score). Αυτή η συνάρτηση εκτιμά τη συγγένεια δέσμευσης μεταξύ του συνδέτη και του υποδοχέα σε κάθε θέση και λαμβάνει υπόψη παράγοντες όπως οι δυνάμεις Van der Waals, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και οι δεσμοί υδρογόνου. Η πόζα με του συνδέτη με τη χαμηλότερη ενέργεια ή την υψηλότερη βαθμολογία θεωρείται συνήθως η καλύτερη. [153][154][155]

Όσον αφορά την ικανότητα της Ισατίνης και των αναλόγων της να δεσμεύονται στην Nsp-15 πραγματοποιήθηκαν υπολογιστικές μελέτες μοριακής πρόσδεσης, για τις οποίες λήφθηκε υπόψη η δομή PDB ID:6WXC. Πριν από την έναρξη των υπολογισμών της πρόσδεσης,

πραγματοποιήθηκε ανάλυση ακτίνων Χ της δομής, ώστε να γίνει εντοπισμός μορίων νερού με ενδεχόμενη σημαντική δομική συνάφεια. Αυτό πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος Grid2021. Με κριτήριο την ενέργεια αλληλεπίδρασης, επιλέχθηκαν μόρια νερού, τα οποία παρουσιάζουν ενέργεια αλληλεπίδρασης άνω των  $-12$  kcal/mol, με μόνο ένα μόριο νερού να πληροί αυτές τις προϋποθέσεις. Αυτό το μόριο νερού στη συνέχεια συμπεριλήφθηκε και στους μετέπειτα υπολογισμούς. Πριν από τους υπολογισμούς, προετοιμάστηκαν οι δομές του συνδέτη με χρήση του προγράμματος Glide (Schrodinger suite 2023.3), το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε και για τους υπολογισμούς. Οι παράμετροι που απαιτούνται για τους υπολογισμούς σύνδεσης προσδιορίστηκαν λαμβάνοντας υπόψη το κέντρο μάζας του συν-κρυσταλλωμένου συνδέτη (Tiriracil), ως το κεντρικό σημείο αναφοράς. Το πείραμα πρόσδεσης εκτελέστηκε χρησιμοποιώντας την τυπική διαδικασία ακριβείας και την ενέργεια αλληλεπίδρασης με χρήση του GlideScore. Οι πόζες με το πιο αρνητικό GlideScore είναι αυτές που αναλύθηκαν περαιτέρω.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα μόρια του νερού μπορούν να διαδραματίσουν κρίσιμο ρόλο στην αναγνώριση του συνδέτη της πρωτεΐνης, [156] οι υπολογιστικές μας μελέτες επικεντρώθηκαν αρχικά στον εντοπισμό μορίων νερού, που αλληλεπιδρούν έντονα με την καταλυτική θέση. Αυτή η ανάλυση διεξήχθη χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Grid [157], και υπέδειξε ότι ένα μόνο μόριο νερού, μεταξύ αυτών που παρατηρούνται στη δομή των ακτίνων Χ, (υπόλειμμα WAT680) έχει μια αρκετά αρνητική προβλεπόμενη ενέργεια δέσμευσης.

Οι υπολογισμοί αρχικά πραγματοποιήθηκαν για 5 ανάλογα της Ισατίνης: 5,7-διβρωμοϊνδολινο-2,3-διόνη, 5-νιτροϊνδολινο-2,3-διόνη, 5-φθοροϊνδολινο-2,3-διόνη, 5-ιοδοϊνδολινο-2,3-διόνη και 5-βρωμοϊνδολινο-2,3-διόνη. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα πρόσδεσης στην Nsp-15 παρουσιάζονται παρακάτω στην **Εικόνα 116**.



**Εικόνα 116.** Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης των πέντε αναλόγων της Ισατίνης (1*H*-ινδολινο-2,3-διόνη). Οι δεσμοί *H* παριστάνονται ως κίτρινες διακεκομμένες γραμμές και οι αντίστοιχες αποστάσεις μετρούνται σε Å. Α) 5,7-διβρωμοϊνδολινο-2,3-διόνη, Β) 5-νιτροϊνδολινο-2,3-διόνη, Γ) 5-φθοροϊνδολινο-2,3-διόνη, Δ) 5-ιοδοϊνδολινο-2,3-διόνη, Ε) 5-

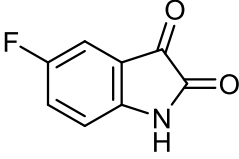
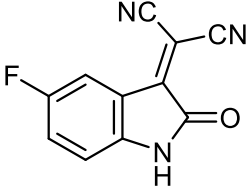
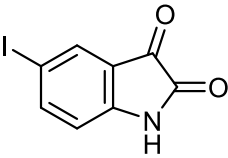
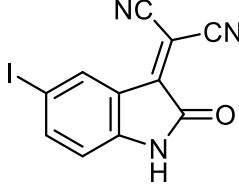
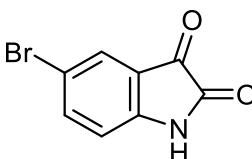
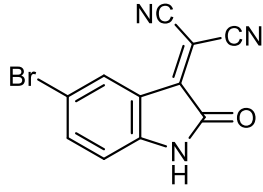
βρωμοϊνδολινο-2,3-διόνη. Επιπλέον, παρουσιάζεται συνοπτικός πίνακας των ενεργειών πρόσδεσης (σε kcal/mol) των αναλόγων αυτών στην Nsp-15.

Όπως παρατηρούμε στις αντίστοιχες πόζες, τα πέντε ανάλογα της Ισατίνης εισέρχονται στη θέση δέσμευσης, παρόμοια με την Τιπιρακίλη. Η δέσμευσή τους μπορεί να χαρακτηριστεί ως ικανοποιητική, γεγονός που φανερώνεται και από τις αντίστοιχες ενέργειες δέσμευσης, οι οποίες είναι της τάξης των -25 kcal/mol. Συγκεκριμένα, και τα πέντε αυτά μόρια αναπτύσσουν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του καρβονυλίου (C-3) και του θετικά φορτισμένου αμινοξέος Lys290, το οποίο όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελεί ένα από τα τρία αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας και έχει σημαντικό ρόλο στην καταλυτική δράση του ενζύμου. Επιπρόσθετα, το δεύτερο καρβονύλιο (C-2) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με τον βασικό κορμό της Ser294, ενώ το άζωτο του ινδολικού δακτυλίου NH αλληλεπιδρά με την πλευρική αλυσίδα της Ser294. Η αλληλεπίδραση με αυτό το αμινοξύ είναι ζωτικής σημασίας, καθώς η Ser294 είναι υπεύθυνη για την ειδικότητα της Nsp-15 να διασπά ουριδίνη.

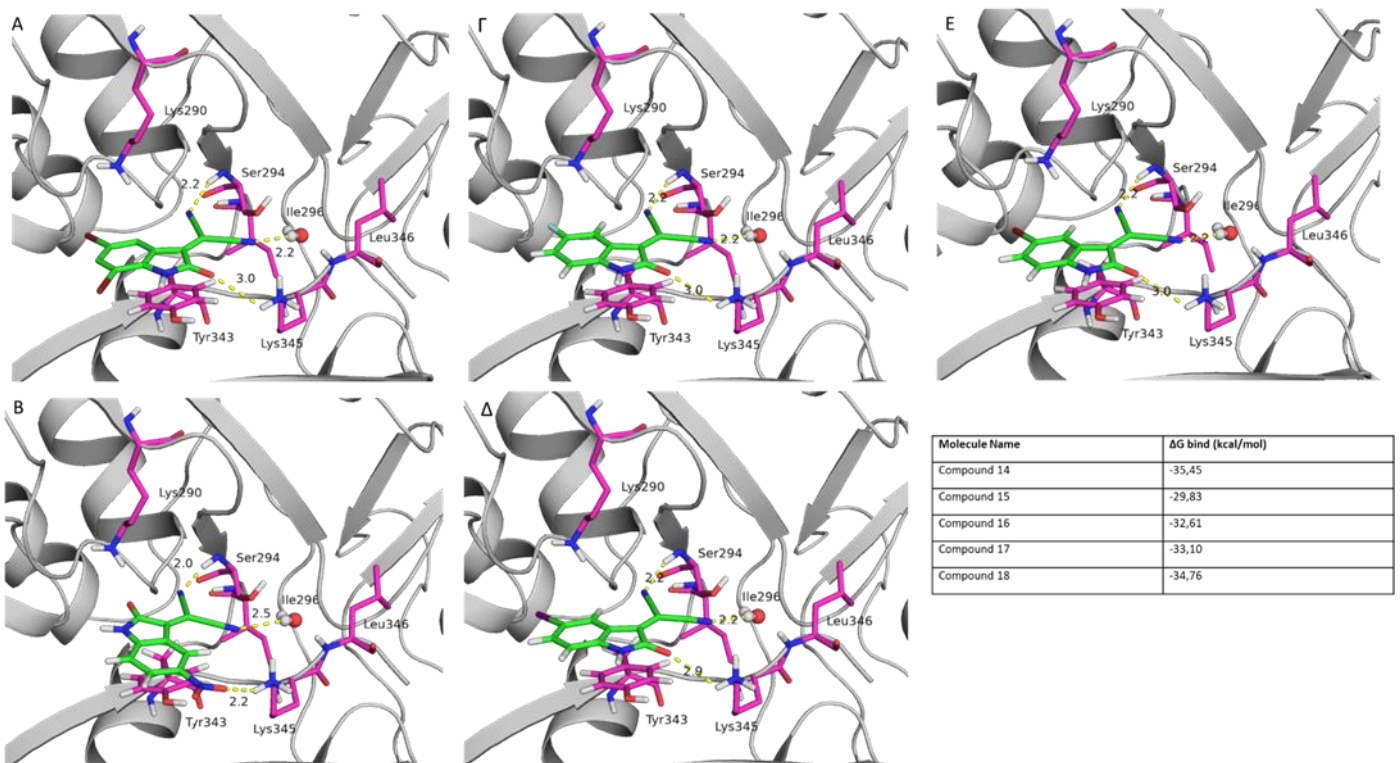
Παρατηρώντας αυτά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, προσπαθήσαμε να αυξήσουμε την ικανότητα πρόσδεσης αναλόγων της Ισατίνης και έτσι πραγματοποιήσαμε πειράματα μοριακής πρόσδεσης στα ανάλογα στα οποία έχει προσαρτηθεί μία νιτριλο ομάδα στο καρβονύλιο της 3-θέσης. Οι ενώσεις αυτές, (ανάλογα του 2-(2-οξοϊνδολιν-3-υλιδενο)μαλονονιτριλίου, ενώσεις 13-18, όπως παρουσιάζονται και στον παρακάτω πίνακα) μελετήθηκαν όπως και οι πρόδρομες ενώσεις τους και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 117**.

Πρόδρομη ένωση	Δομή	Τροποποιημένο ανάλογο	Δομή
1H-ϊνδολινο-2,3-διόνη (Ισατίνη)		2-(2-οξοϊνδολιν-3-υλιδενο)μαλονονιτρίλιο (Ένωση 13)	
5,7-διβρωμοϊνδολιν-ο-2,3-διόνη		2-(5,7-διβρωμο-2-οξοϊνδολιν-3-υλιδενο)μαλονονιτρίλιο (Ένωση 14)	
5-νιτροϊνδολινο-2,3-διόνη		2-(5-νιτρο-2-οξοϊνδολιν-3-υλιδενο)μαλονονιτρίλιο (Ένωση 15)	



5-φθοροϊνδολινό-2,3-διόνη		2-(5-φθορο-2-οξινδολιν-3-υλιδενο)μαλονονιτρίλιο (Ένωση 16)	
5-ιοδοϊνδολινό-2,3-διόνη		2-(5-ιοδο-2-οξινδολιν-3-υλιδενο)μαλονονιτρίλιο (Ένωση 17)	
5-βρωμοϊνδολινό-2,3-διόνη		2-(5-βρωμο-2-οξινδολιν-3-υλιδενο)μαλονονιτρίλιο (Ένωση 18)	

**Πίνακας 4.** Δομές των πέντε αναλόγων της Ισατίνης πριν και μετά την προσάρτηση των νιτλιο-ομάδων.

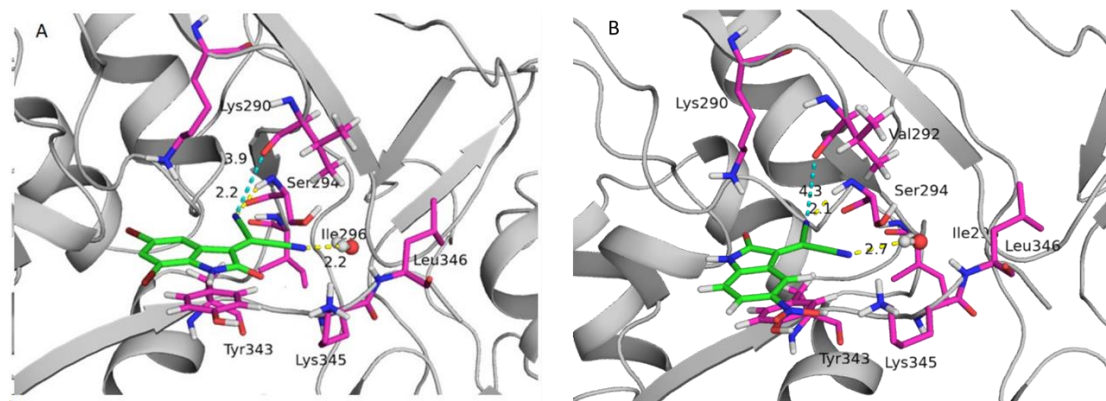


**Εικόνα 117.** Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης των νέων τροποποιημένων πέντε αναλόγων του 2-(2-οξινδολιν-3-υλιδενο)μαλονονιτρίλιου. Οι δεσμοί H παριστάνονται ως κίτρινες διακεκομμένες γραμμές και οι αντίστοιχες αποστάσεις μετρούνται σε Å. Α) 2-(5,7-διβρωμο-2-οξινδολιν-3-υλιδενο)μαλονονιτρίλιο (Ένωση 14), Β) 2-(5-νιτρο-2-οξινδολιν-3-υλιδενο)μαλονονιτρίλιο (Ένωση 15), Γ) 2-(5-φθορο-2-οξινδολιν-3-υλιδενο)μαλονονιτρίλιο

(Ένωση 16), Δ) 2-(5-ιοδο-2-οξοϊνδολιν-3-υλιδενο)μαλονονιτρίλιο (Ένωση 17), Ε) 2-(5-βρωμο-2-οξοϊνδολιν-3-υλιδενο)μαλονονιτρίλιο (Ένωση 18). Επιπλέον, παρουσιάζεται συνοπτικός πίνακας των ενεργειών πρόσδεσης (σε kcal/mol) των αναλόγων αυτών στην Nsp-15.

Όπως παρατηρούμε στις αντίστοιχες πόζες, τα τροποποιημένα ανάλογα μετά την ενσωμάτωση των νιτριλο-ομάδων εισέρχονται στη θέση δέσμευσης της πρωτεΐνης με ελαφρώς διαφορετικό τρόπο πρόσδεσης σε σχέση με τα πρόδρομα μόρια, λόγω των ομάδων αυτών. Η δέσμευσή τους αναμένεται εμφανώς βελτιωμένη σε σχέση με τα πρόδρομα μόρια, όπως διαπιστώνεται και από τις αντίστοιχες ενέργειες δέσμευσης, οι οποίες είναι της τάξης των -30 έως -35 kcal/mol. Συγκεκριμένα, τα τέσσερα από τα πέντε ανάλογα εμφανίζουν παρόμοιες αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της περιοχής δέσμευσης. Το ανάλογο που φέρει τη νιτρο-ομάδα (Ένωση 15) είναι το μοναδικό, το οποίο εμφανίζει διαφορετική διεύθυνση στον χώρο.

1) Αλληλεπιδράσεις λόγω της νιτριλο-ομάδας: Ειδικότερα, για τα τέσσερα ανάλογα, που φέρουν κάποιο άτομο αλογόνου, όπως επίσης και για αυτό που φέρει νιτρο-ομάδα, παρατηρούμε πως οι νιτριλο-ομάδες αναπτύσσουν αλληλεπίδραση τύπου δεσμού υδρογόνου με τον βασικό κορμό της Ser294, με την πλευρική αλυσίδα της Val292 και με το μόριο νερού WAT680, όπως παρουσιάζεται και στην **Εικόνα 118**. Αυτή η επιπλέον αλληλεπίδραση με το μόριο νερού, την οποία εμφανίζουν τα μόρια μετά την ενσωμάτωση της νιτριλο-ομάδας, φαίνεται να είναι μεγίστης σημασίας για την καλύτερη πρόσδεση. Το γεγονός αυτό έρχεται και σε συμφωνία με αρκετά βιβλιογραφικά δεδομένα, τα οποία υποστηρίζουν πως μόρια νερού, διατηρημένα σε αρκετές πρωτεΐνες-στόχους, εμφανίζουν αλληλεπίδραση με νιτριλο-ομάδες, φαινόμενο που έχει οδηγήσει σε αξιοσημείωτη αύξηση της ικανότητας πρόσδεσης διαφόρων φαρμακοφόρων ενώσεων. [158]

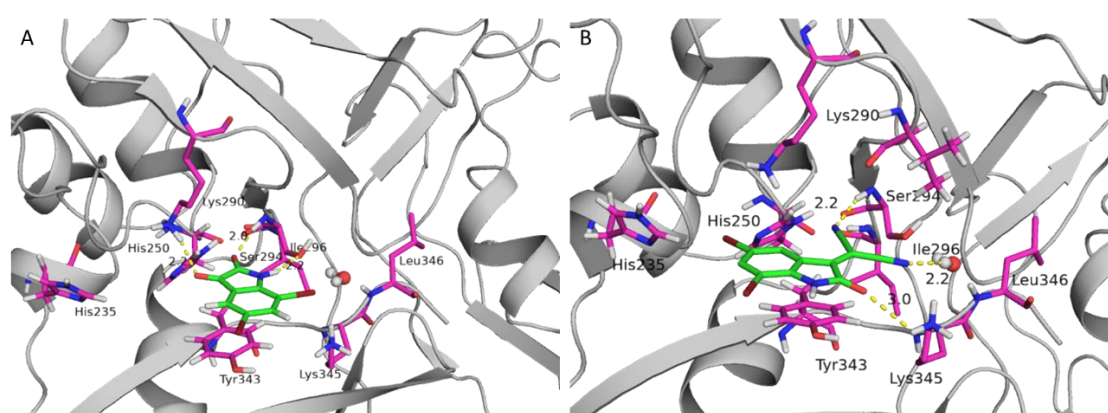


**Εικόνα 118.** Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης με έμφαση στις αλληλεπιδράσεις που οφείλονται στην παρουσία της νιτριλο-ομάδας. Α) Ένωση 14, η οποία φέρει αλογόνο ως υποκαταστάτη, Β) Ένωση 15, η οποία φέρει τη νιτρο-ομάδα ως υποκαταστάτη.

2) Επιπρόσθετες αλληλεπιδράσεις: Εκτός των αλληλεπιδράσεων, που προκύπτουν από την ύπαρξη της νιτριλο-ομάδας, αναπτύσσονται και άλλες αλληλεπιδράσεις, λόγω της διεύθυνσης που υιοθετούν τα εν λόγω ανάλογα. Συγκεκριμένα, για τα τέσσερα ανάλογα που φέρουν κάποιο άτομο αλογόνου, το καρβονύλιο (C-2) αναπτύσσει δεσμό υδρογόνου με το αμινοξύ Lys345, καθώς επίσης ο αρωματικός δακτύλιος αναπτύσσει π-π αλληλεπιδράσεις (π-π stacking) με τον αρωματικό δακτύλιο της Tyr343. Εν αντιθέσει με τα τέσσερα αυτά μόρια, η Ένωση 15 αναπτύσσει μια αρκετά ισχυρή αλληλεπίδραση μέσω δεσμού υδρογόνου μεταξύ της νιτρο-ομάδας και της Lys345. Αυτή η επιπλέον αλληλεπίδραση ίσως είναι υπεύθυνη για την ελαφρώς διαφορετική διαμόρφωση, που υιοθετεί η Ένωση 15 σε σχέση με τις άλλες

τέσσερις ενώσεις. Τέλος, όπως παρατηρείται, η ένωση αυτή αναπτύσσει αλληλεπίδραση μεταξύ του καρβονυλίου του C-2 και της Lys290, καθώς επίσης και π-π αλληλεπιδράσεις με τον αρωματικό δακτύλιο της Tyr343.

Συνοψίζοντας, παρατηρούμε πως και τα πέντε νέα ανάλογα σχηματίζουν καινούριες αλληλεπιδράσεις (με Ser294, Val292 και WAT680), λόγω της ενσωμάτωσης της νιτριλο-ομάδας. Μπορούμε λοιπόν να υποθέσουμε πως οι αλληλεπιδράσεις αυτές οδηγούν σε ευνοϊκότερη τοποθέτηση των μορίων στη θέση πρόσδεσης και ίσως πιο κοντά στην καταλυτική κοιλότητα του ενζύμου. Αυτό γίνεται εμφανές συγκρίνοντας τα αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης ενός πρόδρομου μορίου με το αντίστοιχο ανάλογό του μετά την ενσωμάτωση της νιτριλο-ομάδας, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 119**. Συγκεκριμένα, διακρίνεται εύκολα πως στα τροποποιημένα ανάλογα (εκτός της Ένωσης 15) εμφανίζεται αλληλεπίδραση και με το αμινοξύ της καταλυτικής τριάδας, His250, αλληλεπίδραση η οποία δεν υφίσταται στα πρόδρομα μόρια.



**Εικόνα 119.** Σύγκριση των αποτελεσμάτων μοριακής πρόσδεσης της Ένωσης 14 με το πρόδρομο μόριο αυτής. Είναι εμφανής η ευνοϊκότερη τοποθέτηση κοντά στην καταλυτική κοιλότητα του ενζύμου, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από την αλληλεπίδραση του ατόμου Br με την His250. Α) 5,7-διβρωμοϊσατίνη, Β) Ένωση 14.

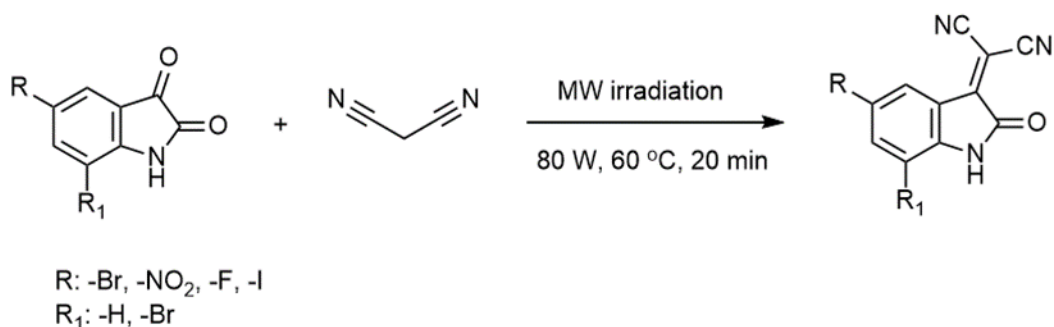
Λαμβάνοντας υπόψη όλα αυτά, μπορούμε λογικά να θεωρήσουμε πως η ενσωμάτωση της νιτριλο-ομάδας κρίνεται κρίσιμη και για την ανασταλτική ικανότητα των νέων μορίων σε σύγκριση με τα πρόδρομα. Βέβαια αυτό πρέπει να επιβεβαιωθεί και με *in vitro* πειράματα για να μπορούμε να ισχυριστούμε πως αυτή η τροποποίηση οδήγησε σε αύξηση της ανασταλτικής ικανότητας και πως ο αρχικός ισχυρισμός ήταν σωστός.

### 5.1.3 Γενική συνθετική πορεία των αναλόγων της Ισατίνης, στα οποία έχει ενσωματωθεί η νιτριλο-ομάδα

Τα ανάλογα του 2-(2-οξοϊνδολιν-3-υλιδενο)μαλονονιτριλίου έχουν ήδη συντεθεί από διάφορες ερευνητικές ομάδες, μέσω μιας συμπύκνωσης Knoevenagel, με μία πληθώρα διαφορετικών μεθόδων σε καλές αποδόσεις και μικρούς χρόνους αντίδρασης. Συγκεκριμένα, η πιο κλασική προσέγγιση περιλαμβάνει τη χρήση οργανικών διαλυτών, όπως ακετονιτριλίο ή αιθανόλη και χρήση κάποιας βάσης, όπως πιπεριδίνη. [159] Άλλες ερευνητικές ομάδες έχουν χρησιμοποιήσει ιονικά υγρά ή και κάποιους καταλύτες για να επιτύχουν τη σύνθεση αυτών των μορίων σε χρόνους από 20 λεπτά μέχρι και κάποιες ώρες και με αποδόσεις της τάξης του 90%. [160][161][162] Αυτές οι συνθετικές προσεγγίσεις μολονότι είναι αρκετά αποδοτικές, εμφανίζουν κάποια μειονεκτήματα, καθώς ενδέχεται να μην είναι φιλικές προς το περιβάλλον και να χαρακτηρίζονται από υψηλό κόστος. Έτσι, οι πιο πρόσφατες

προσεγγίσεις επικεντρώνονται γύρω από τη χρήση συστημάτων φιλικών προς το περιβάλλον με χρήση πολικών πρωτικών διαλυτών, όπως αιθανόλη και νερό. [163][164] Για παράδειγμα, το 2-(2-οξοϊνδολιν-3-υλιδενο)μαλονονιτρίλιο και τα ανάλογά του μπορούν να συντεθούν μέσα σε 2 με 5 λεπτά, με χρήση του συστήματος Αιθανόλη/Νερό (3:7 v/v), χωρίς τη χρήση κάποιου καταλύτη, με τελικές αποδόσεις της τάξης του 80-87%. [165]

Για τη σύνθεση των αναλόγων αυτών εμείς επιλέξαμε μια νέα συνθετική προσέγγιση, η οποία δεν περιλαμβάνει τη χρήση κάποιου οργανικού διαλύτη ή κάποιου καταλύτη, αλλά υποβοηθείται από τη χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας.



**Εικόνα 120.** Σχηματική αναπαράσταση της γενικής συνθετικής πορείας των υποκατεστημένων αναλόγων του 2-(2-οξοϊνδολιν-3-υλιδενο)μαλονονιτρίλιου.

Αρχικά για να διαπιστωθεί εάν η σύνθεση των συγκεκριμένων αναλόγων της Ισατίνης είναι αποδοτική με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, συντέθηκε αρχικά το μόριο, το οποίο διαθέτει τη νιτριλο-ομάδα, χωρίς κάποιον υποκαταστάτη στην 5-θέση ή στην 7-θέση του δακτυλίου και έπειτα ακολουθήθηκε η ίδια πορεία για το εκάστοτε ανάλογο.

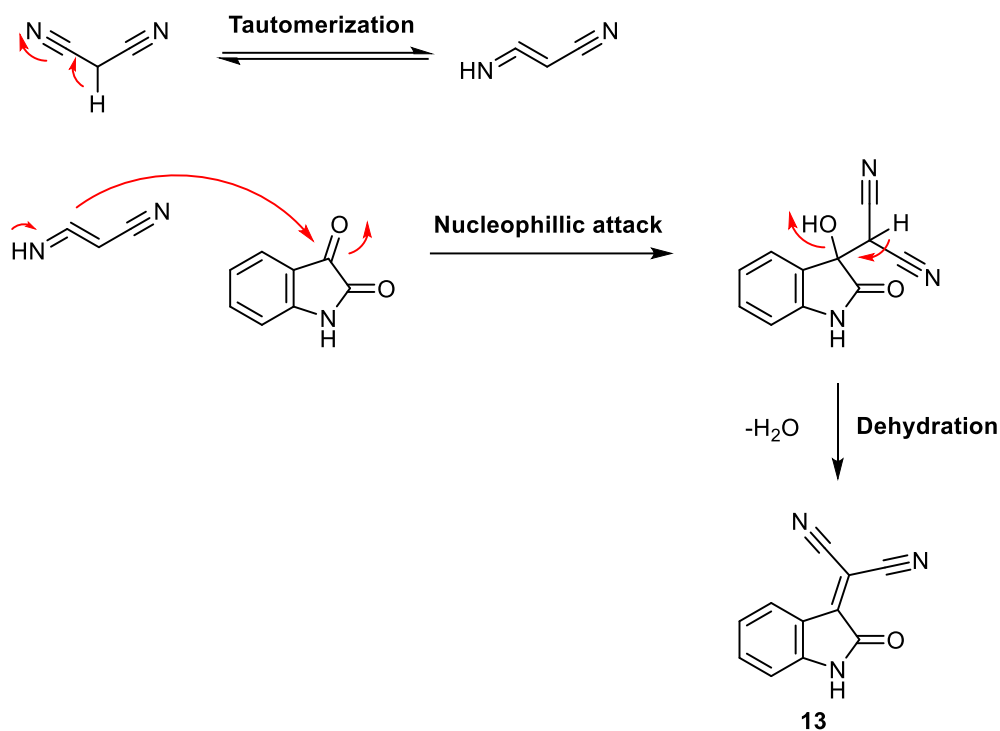
#### Πειραματική πορεία

Η Ισατίνη (100 mg, 0,6797 mmol) και το μαλονονιτρίλιο (57 μl, 1,0196 mmol) μεταφέρθηκαν σε κατάλληλο αυτόκλειστο δοχείο, και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο σύνθεσης με τη χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας. Το αντιδρών μίγμα ακτινοβολήθηκε με ισχύ 80 Watt, σε θερμοκρασία 60 °C για 20 λεπτά. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών ανάπτυξης 5% v/v μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο, όπου διαπιστώθηκε η σχεδόν πλήρης κατανάλωση των αντιδρώντων. Η απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (Silica gel) σε σύστημα διαλυτών έκλουσης 100% διχλωρομεθάνιο με σταδιακή αύξηση της πολικότητας έως 1,5% μεθανόλης σε διχλωρομεθάνιο, ποσοστό στο οποίο παραλήφθηκε το επιθυμητό κόκκινο στερεό με απόδοση 94% (125 mg).

#### Πιθανός μηχανισμός της εν λόγω αντίδρασης

Η σύνθεση της ένωσης **13** επιτυγχάνεται μέσω μιας αντίδρασης συμπύκνωσης Knoevenagel μεταξύ του άνθρακα του μαλονονιτρίλιου και του καρβονυλικού άνθρακα της Ισατίνης. Το σημαντικό της εν λόγω συνθετικής πορείας με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο έγκειται στο γεγονός πως δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιος οργανικός διαλύτης, ενώ συγχρόνως ο χρόνος της αντίδρασης είναι αρκετά μικρός.

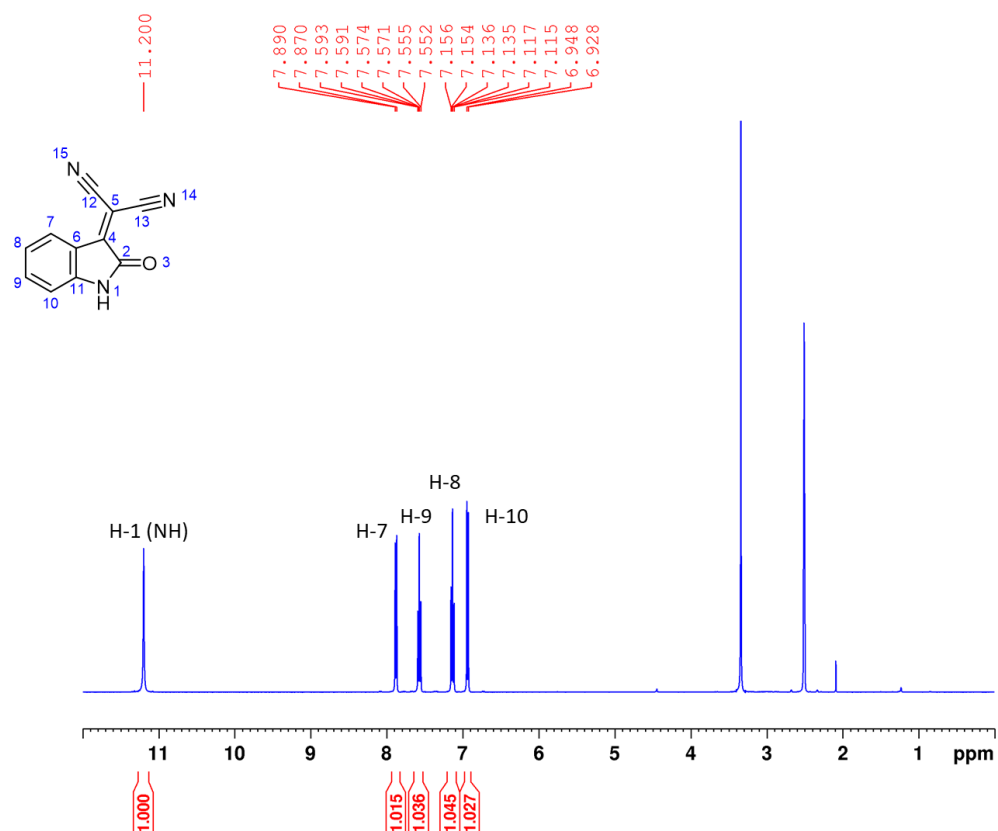


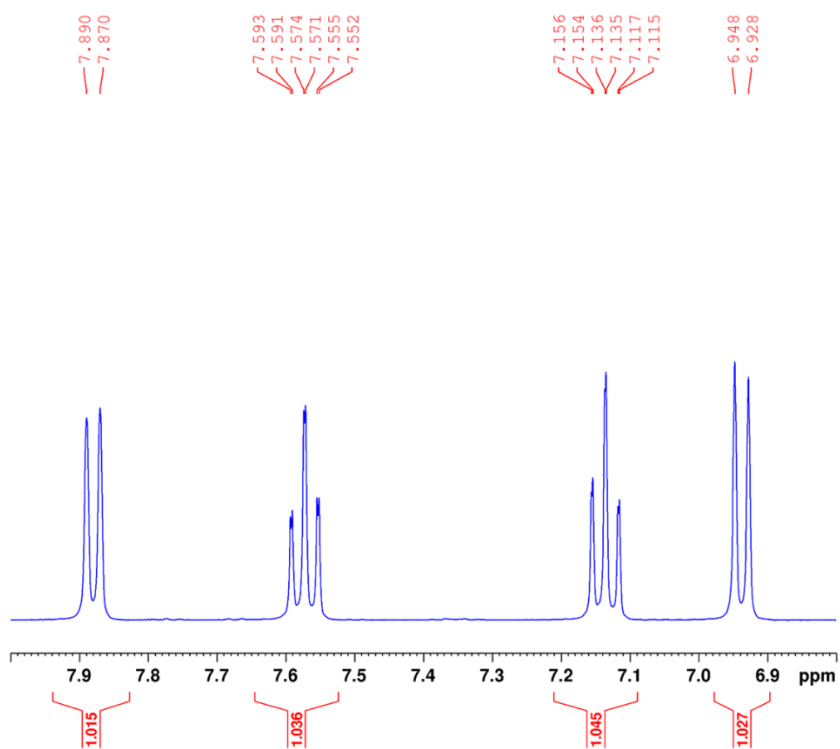


**Εικόνα 121.** Αναπαράσταση του προτεινόμενου μηχανισμού σύνθεσης της ένωσης **13**, μέσω μιας συμπύκνωσης Knoevenagel.

Ταυτοποίηση της ένωσης **13**

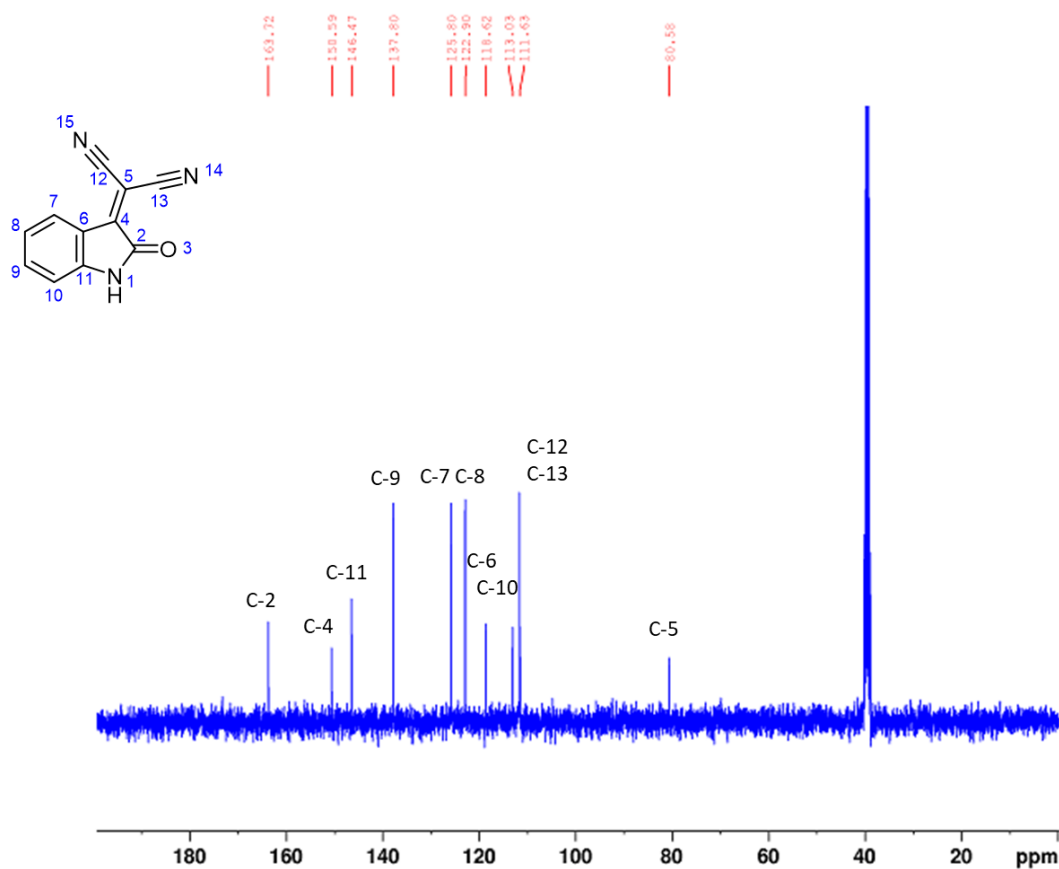
Ακολουθεί η ταυτοποίηση της ένωσης **13** με φασματοσκοπία NMR  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ .





**Εικόνα 122.** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 13 και μεγέθυνση στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}^6$  (400 MHz, 25 °C).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO):  $\delta$  11.20 (s, 1H), 7.88 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, H-7), 7.57 (td,  $J$  = 7.8, 1.2 Hz, 1H, H-9), 7.14 (td,  $J$  = 7.7, 1.0 Hz, 1H, H-8), 6.94 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, H-10).



**Εικόνα 123.** Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 13 σε διαλύτη  $\text{DMSO-}d^6$  (101 MHz, 25 °C).

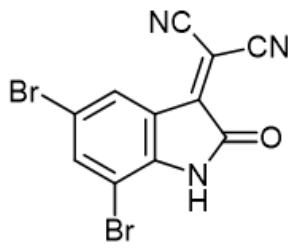
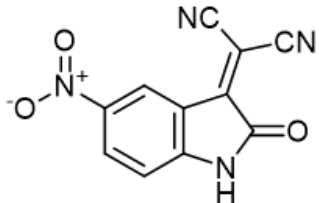
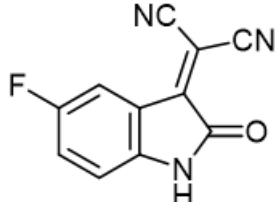
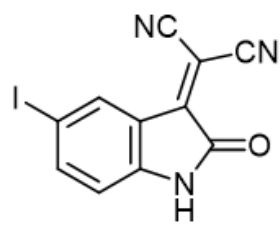
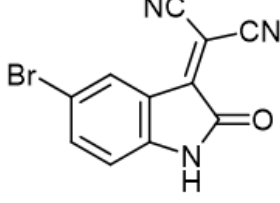
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO):  $\delta$  163.72 (C-2), 150.59 (C-4), 146.47 (C-11), 137.80 (C-9), 125.81 (C-7), 122.90 (C-8), 118.62 (C-6), 113.03 (C-10), 111.58 (C-12 και C-13), 80.59 (C-5).

Παρατηρήσεις:

Η σύνθεση της ένωσης 3 χαρακτηρίζεται επιτυχής, καθώς παρατηρούμε πως στο φάσμα  $^{13}\text{C}$  εμφανίζονται κορυφές στα 111 και 80 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στους άνθρακες της νιτριλο-ομάδας.

**5.1.4 Σύνθεση των ενώσεων 14-18**

Εφόσον το εν λόγω πρωτόκολλο σύνθεσης ήταν επιτυχές, προχωρήσαμε και στη σύνθεση των ενώσεων, που εμφάνισαν ελπιδοφόρα δράση και στα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης. Ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία και για τα πέντε υποκατεστημένα ανάλογα και οι αποδόσεις της σύνθεσης, καθώς και οι ταυτοποιήσεις των ενώσεων παρουσιάζονται παρακάτω.

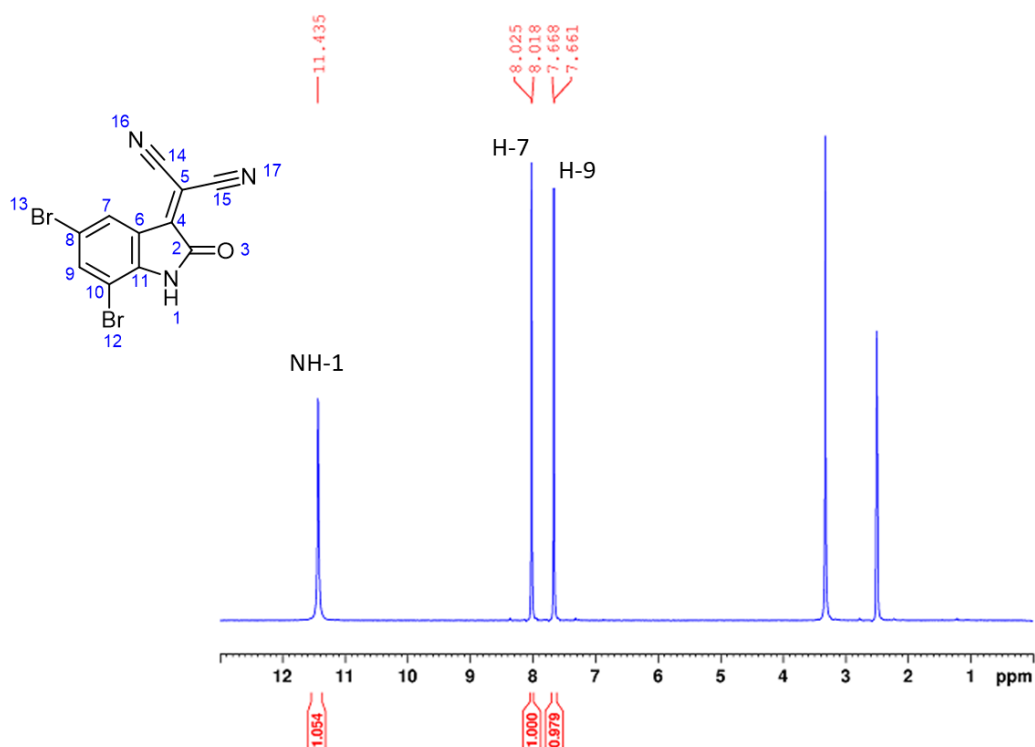
Όνομα Ένωσης	Δομή	Μορφολογία προϊόντος	Απόδοση σύνθεσης
Ένωση 14		Μαύρο στερεό	85 %
Ένωση 15		Ερυθρό στερεό	87 %
Ένωση 16		Ερυθροϊώδες στερεό	83 %
Ένωση 17		Πορτοκαλί στερεό	88 %
Ένωση 18		Ερυθροϊώδες στερεό	90 %

**Πίνακας 5.** Σύνοψη των συνθετικών αποτελεσμάτων για την πρώτη “γενιά” πιθανών αναστολέων της Nsr-15.

Ταυτοποίηση των ενώσεων 14 έως 18

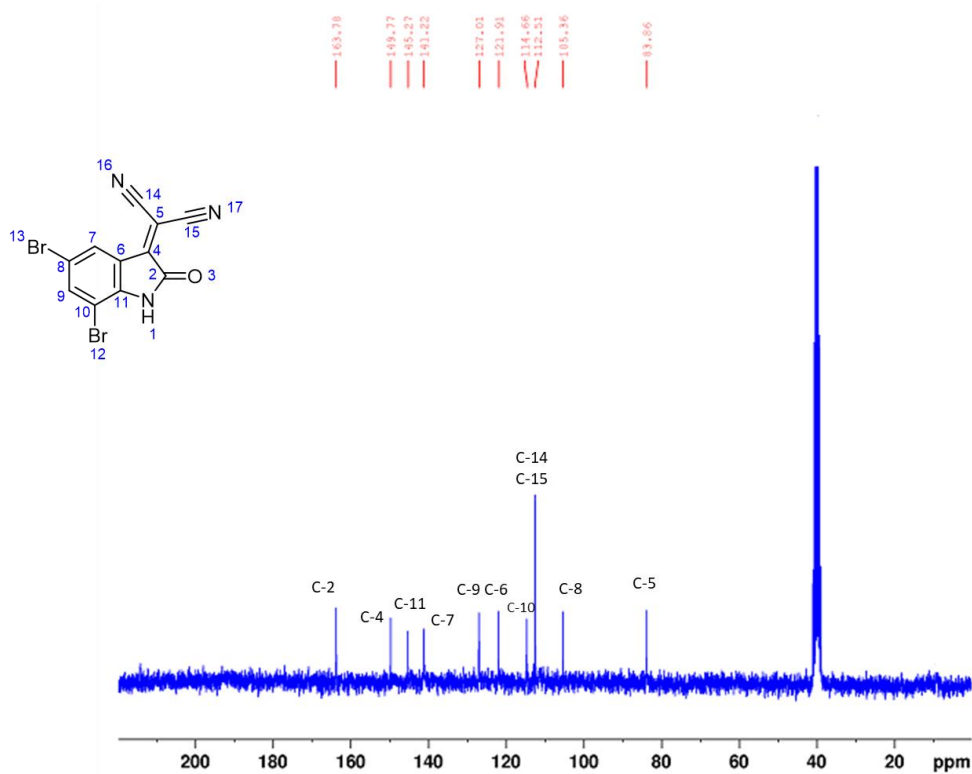
Ακολουθεί η ταυτοποίηση των ενώσεων 14 έως 18 με φασματοσκοπία NMR <sup>1</sup>H και <sup>13</sup>C, καθώς επίσης και με φασματομετρία μάζας.

## Ένωση 14



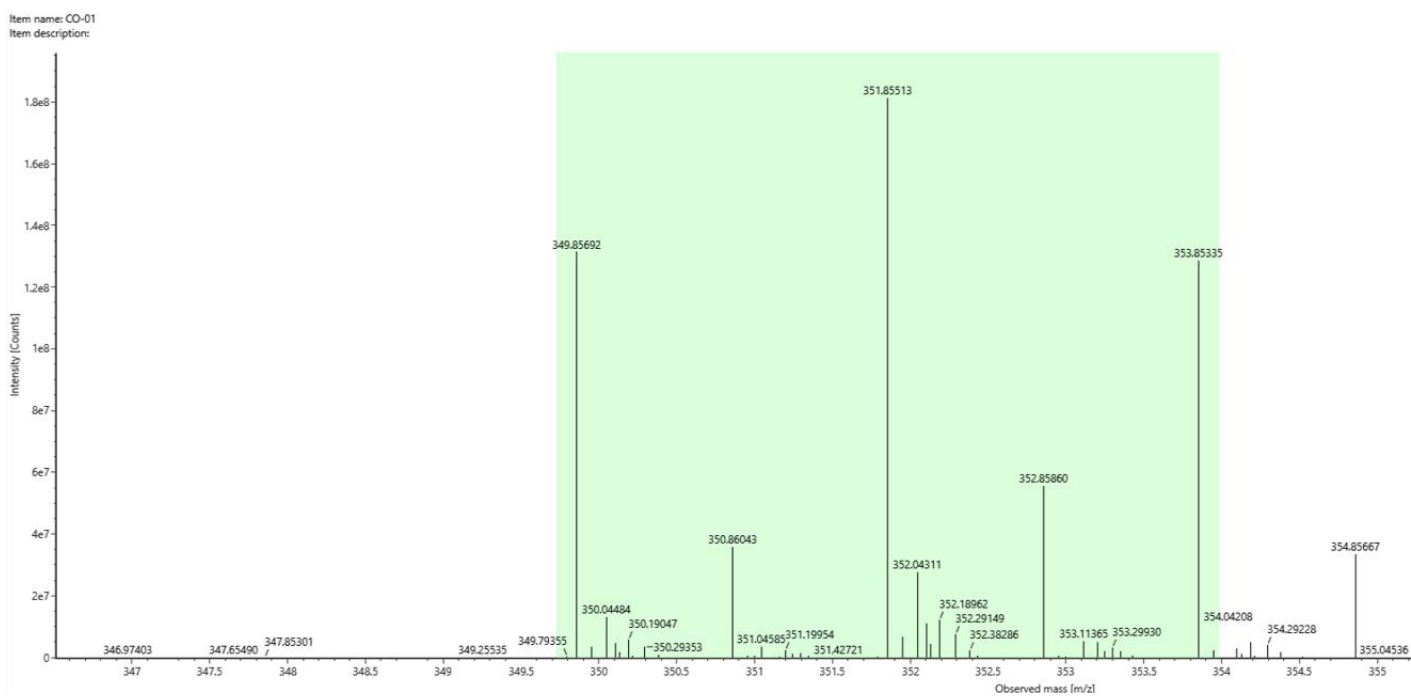
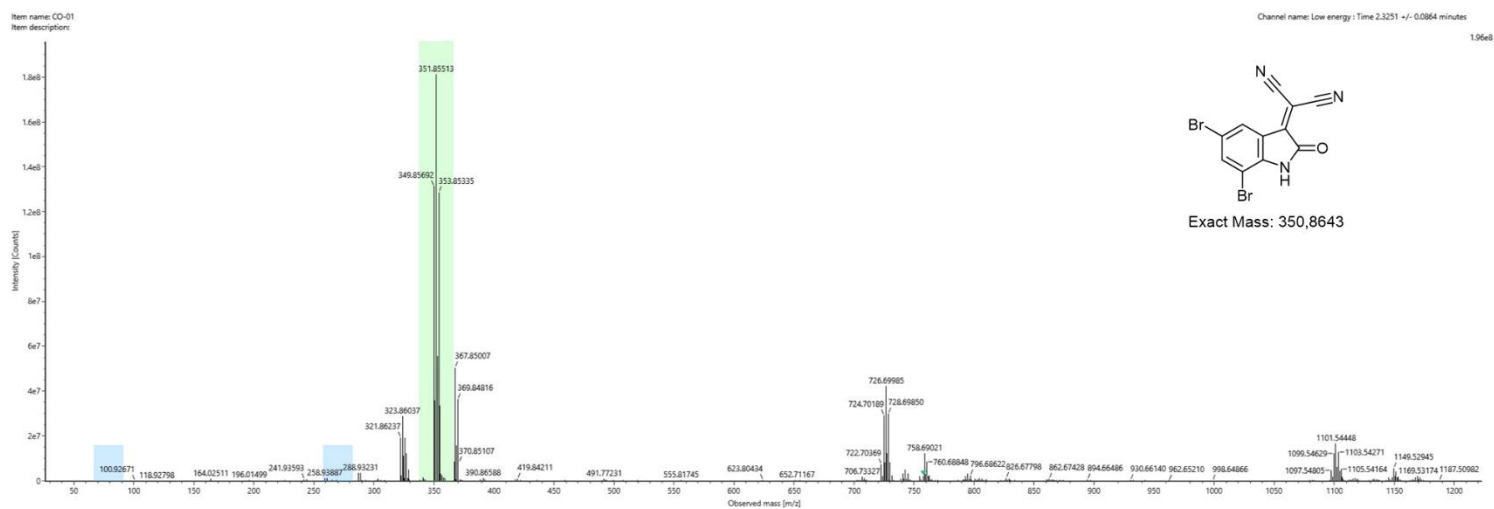
Εικόνα 124. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της ένωσης 14 σε διαλύτη DMSO-d<sup>6</sup> (400 MHz, 25 °C).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO):** δ 11.44 (s, 1H, NH-1), 8.02 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H-7), 7.66 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H-9).



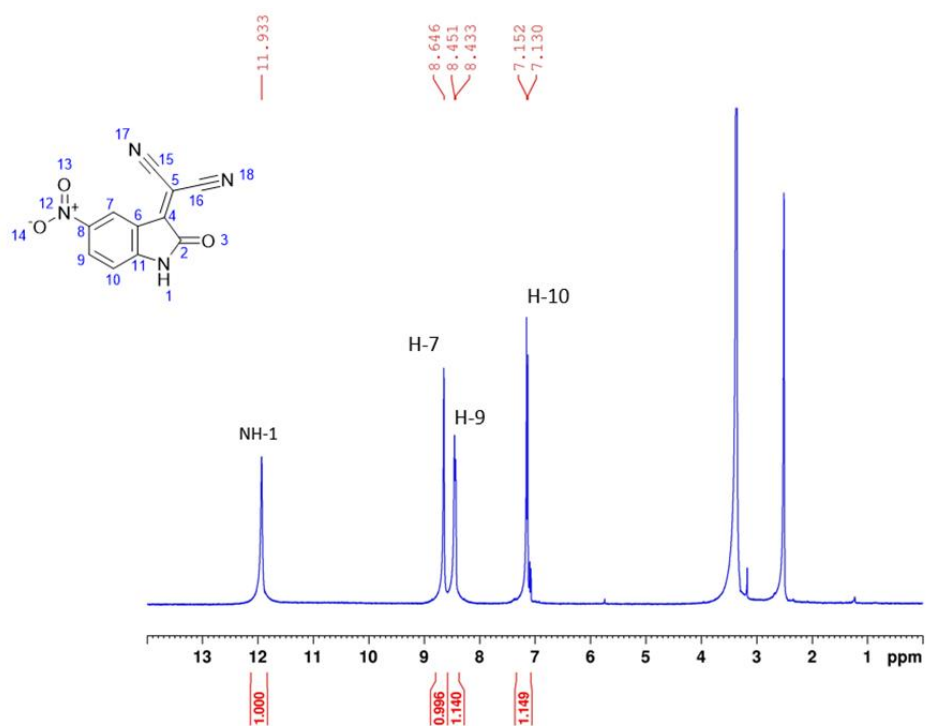
Εικόνα 125. Φάσμα <sup>13</sup>C NMR της ένωσης 14 σε διαλύτη DMSO-d<sup>6</sup> (101 MHz, 25 °C).

**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO):**  $\delta$  163.78 (C-2), 149.77 (C-4), 145.27 (C-11), 141.22 (C-7), 127.01 (C-9), 121.91 (C-6), 114.66 (C-10), 112.52 (C-14 και C-15), 105.35 (C-8), 83.86 (C-5).

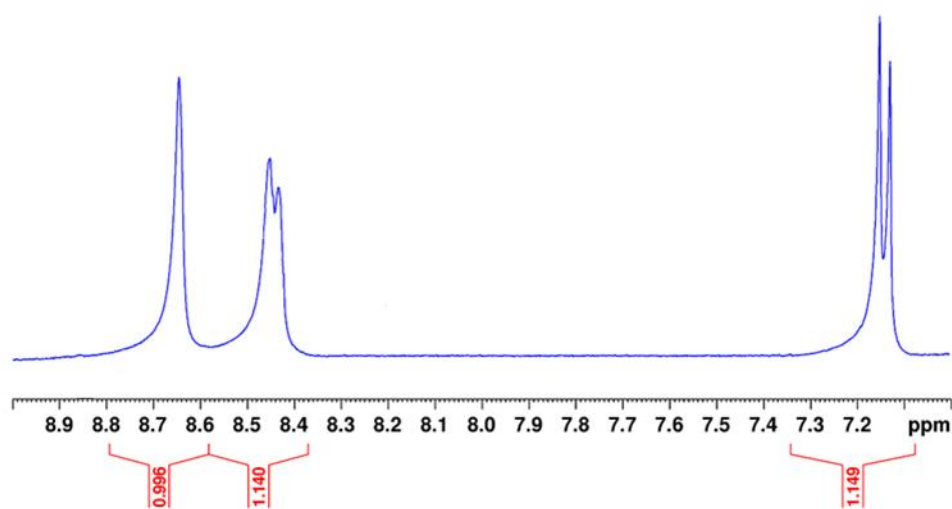


**Εικόνα 126.** Φάσμα μάζας υψηλής ανάλυσης της ένωσης 14. Η κορυφή  $m/z$  ίση με 349.86 αντιστοιχεί στο  $[M-H]^-$ .

## Ένωση 15



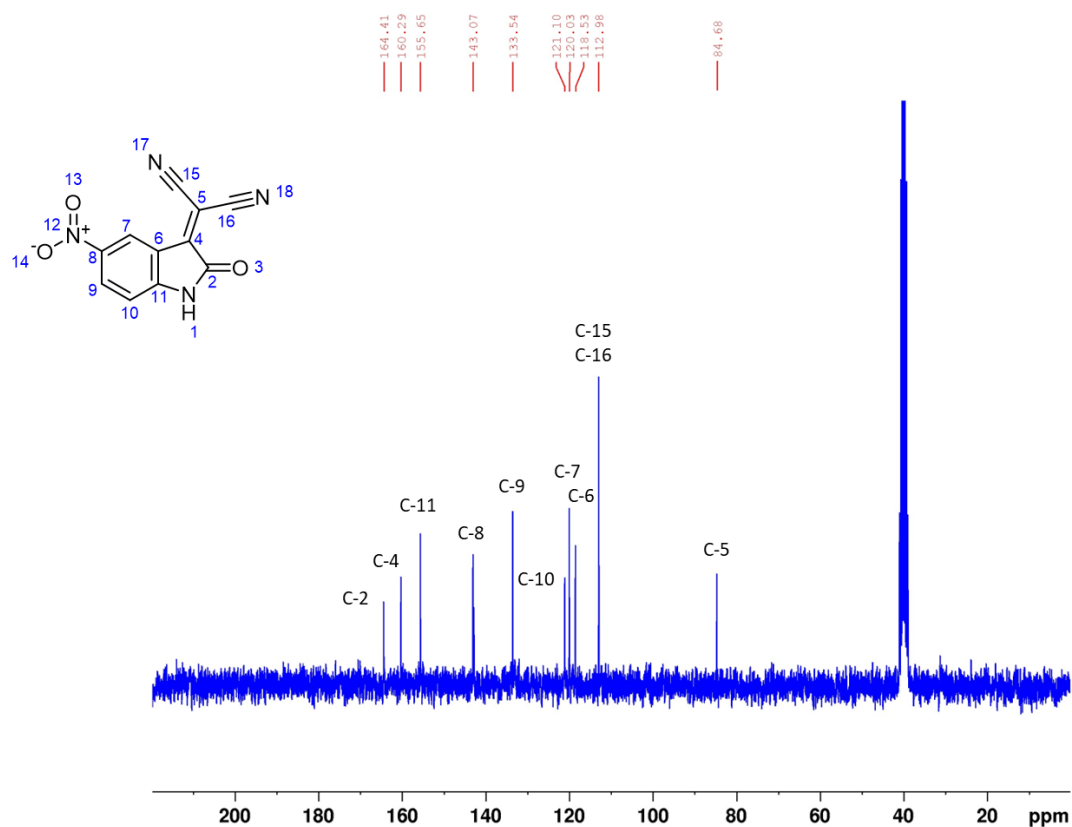
Εικόνα 127. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της ένωσης 15 σε διαλύτη DMSO-d<sup>6</sup> (400 MHz, 25 °C).



Εικόνα 128. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της ένωσης 15 σε διαλύτη DMSO-d<sup>6</sup> με έμφαση στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων (400 MHz, 25 °C).

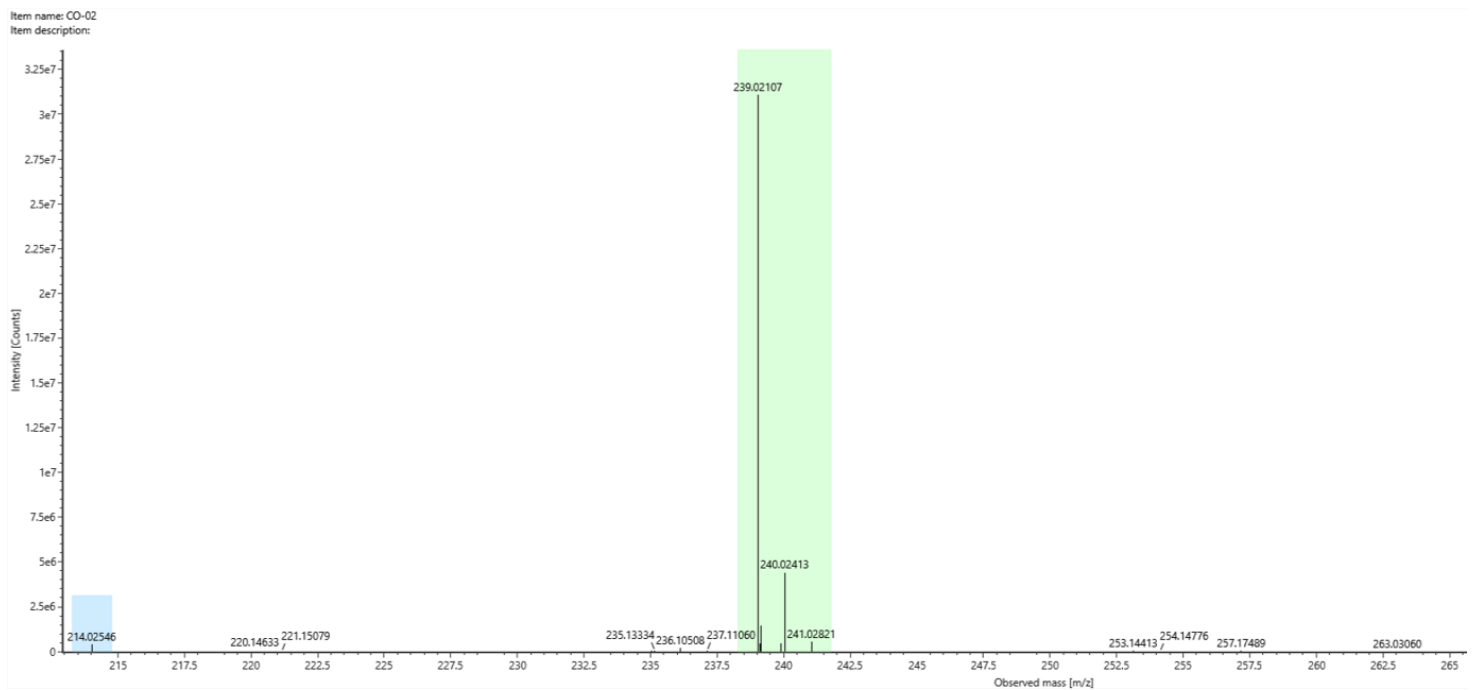
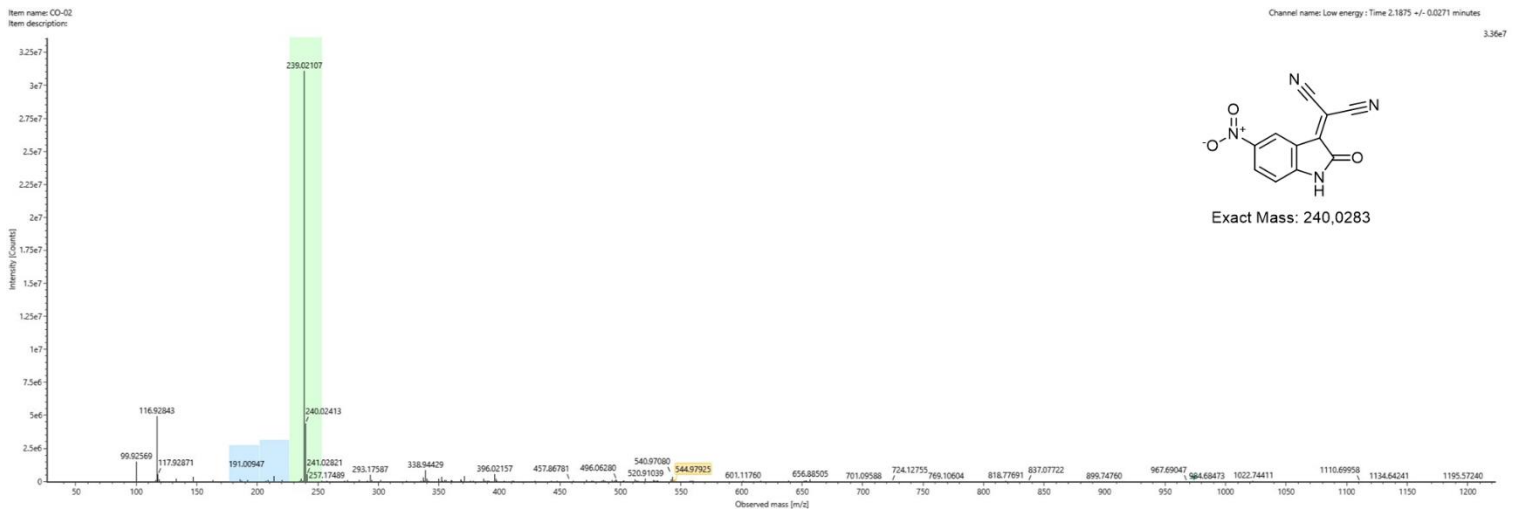
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO):** δ 11.93 (s, 1H, NH-1), 8.65 (s, 1H, H-7), 8.44 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H-9), 7.14 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H, H-10).





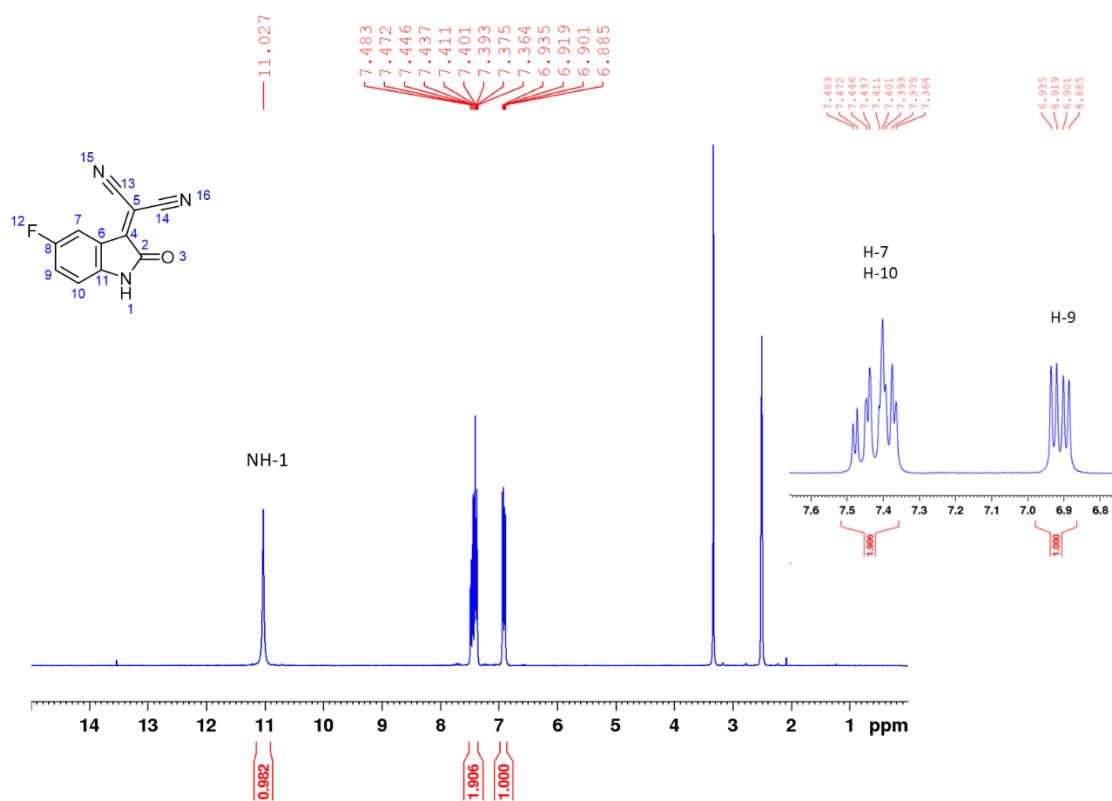
**Εικόνα 129.** Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 15 σε διαλύτη  $\text{DMSO-}d^6$  (101 MHz, 25 °C).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO):  $\delta$  164.42 (C-2), 160.30 (C-4), 155.66 (C-11), 143.07 (C-8), 133.54 (C-9), 121.11 (C-10), 120.04 (C-7), 118.54 (C-6), 112.98 (C-15 και C-16), 84.68 (C-5).



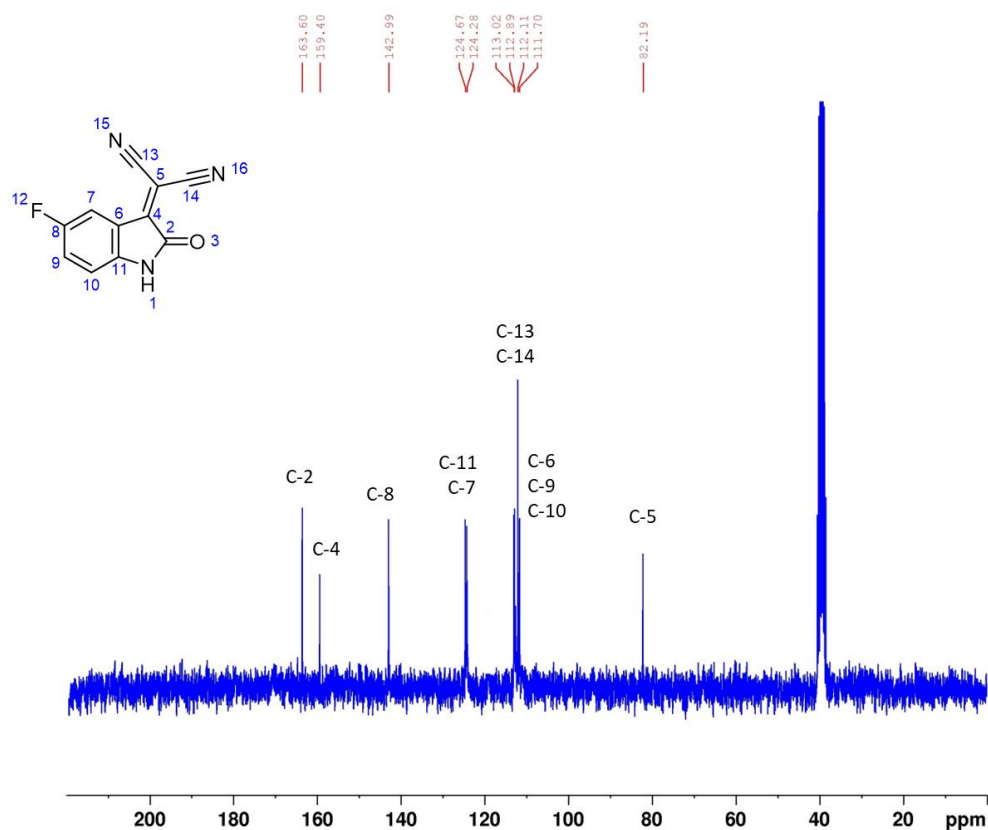
**Εικόνα 130.** Φάσμα μάζας υψηλής ανάλυσης της ένωσης 15. Η κορυφή  $m/z$  ίση με 239.02 αντιστοιχεί στο  $[M-H]^-$ .

## Ένωση 16



Εικόνα 131. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 16 σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  (400 MHz, 25 °C).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}$ ):  $\delta$  11.23 (s, 1H, NH-1), 7.58 – 7.38 (m, 2H, H-7 και H-10), 6.94 (dd,  $J = 8.6, 4.3$  Hz, 1H, H-9).



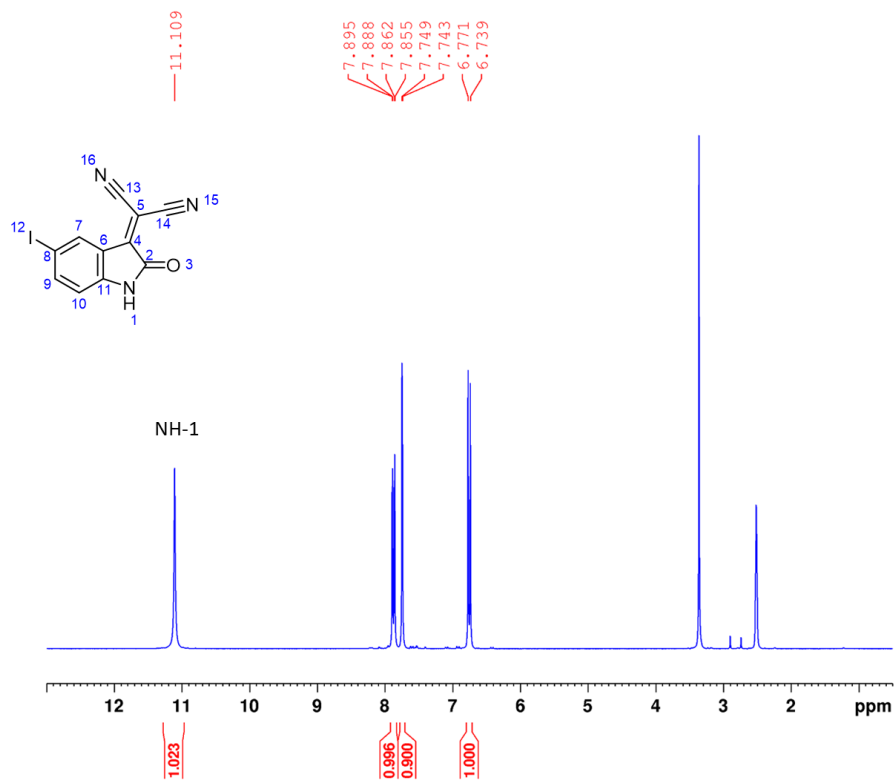
**Εικόνα 132.** Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 16 σε διαλύτη  $\text{DMSO-}d^6$  (101 MHz, 25 °C).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO):  $\delta$  163.60 (C-2), 159.41 (C-4), 142.99 (C-8), 124.67 (C-11), 124.29 (C-7), 113.02, 112.89, 112.11 (C-13 και C-14), 111.70, 82.20 (C-5).

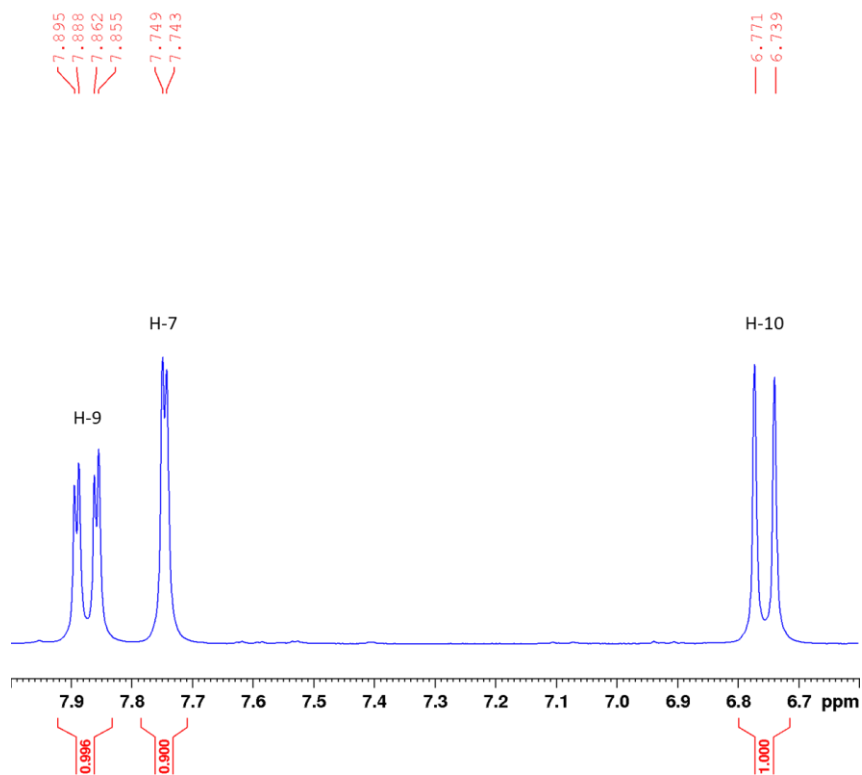
Παρατηρήσεις:

Οι κορυφές στα 113.02, 112.89 και 111.70 λογικά μπορεί να οφείλονται στους άνθρακες 6, 9 και 10. Για πιο σίγουρη ταυτοποίηση θα απαιτούνταν λήψη φάσματος δύο διαστάσεων. Παρόλα αυτά και με το εν λόγω φάσμα μπορούμε να συμπεράνουμε πως η σύνθεση της ένωσης 16 ήταν επιτυχής.

## Ένωση 17

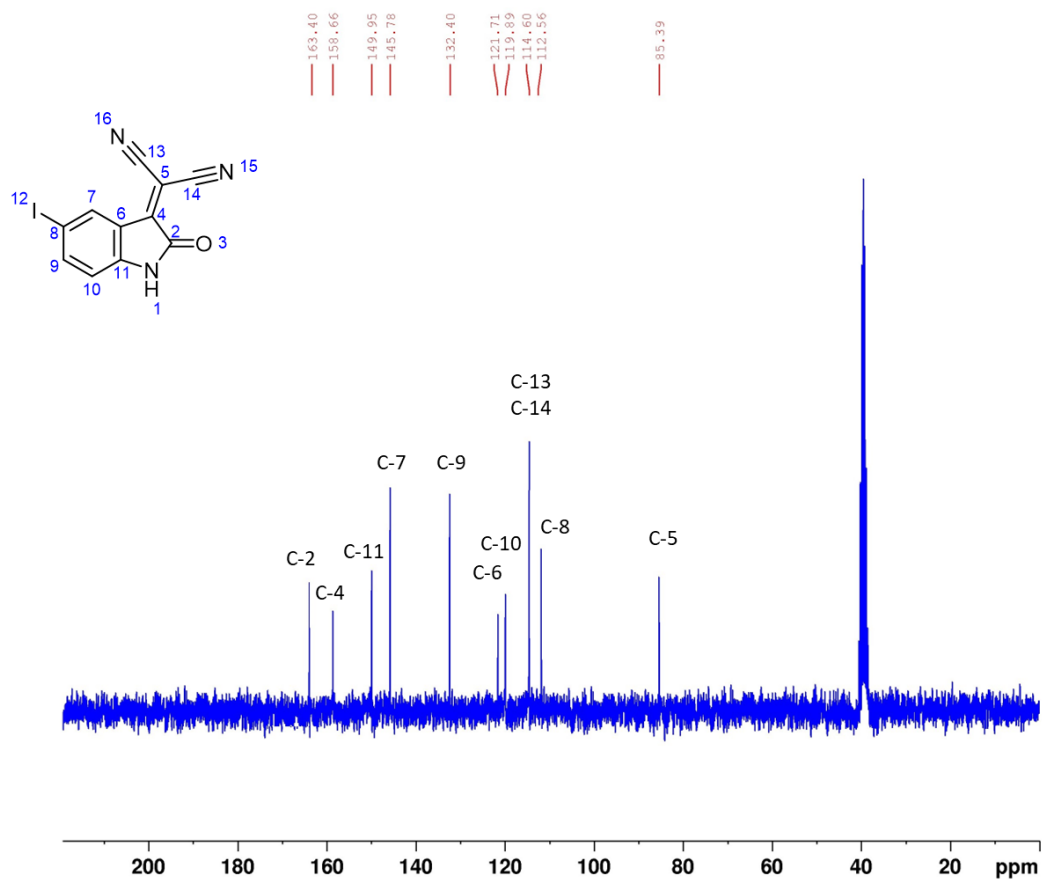


Εικόνα 133. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 17 σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  (400 MHz, 25  $^\circ\text{C}$ ).



Εικόνα 134. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 15 σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  με έμφαση στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων (400 MHz, 25  $^\circ\text{C}$ ).

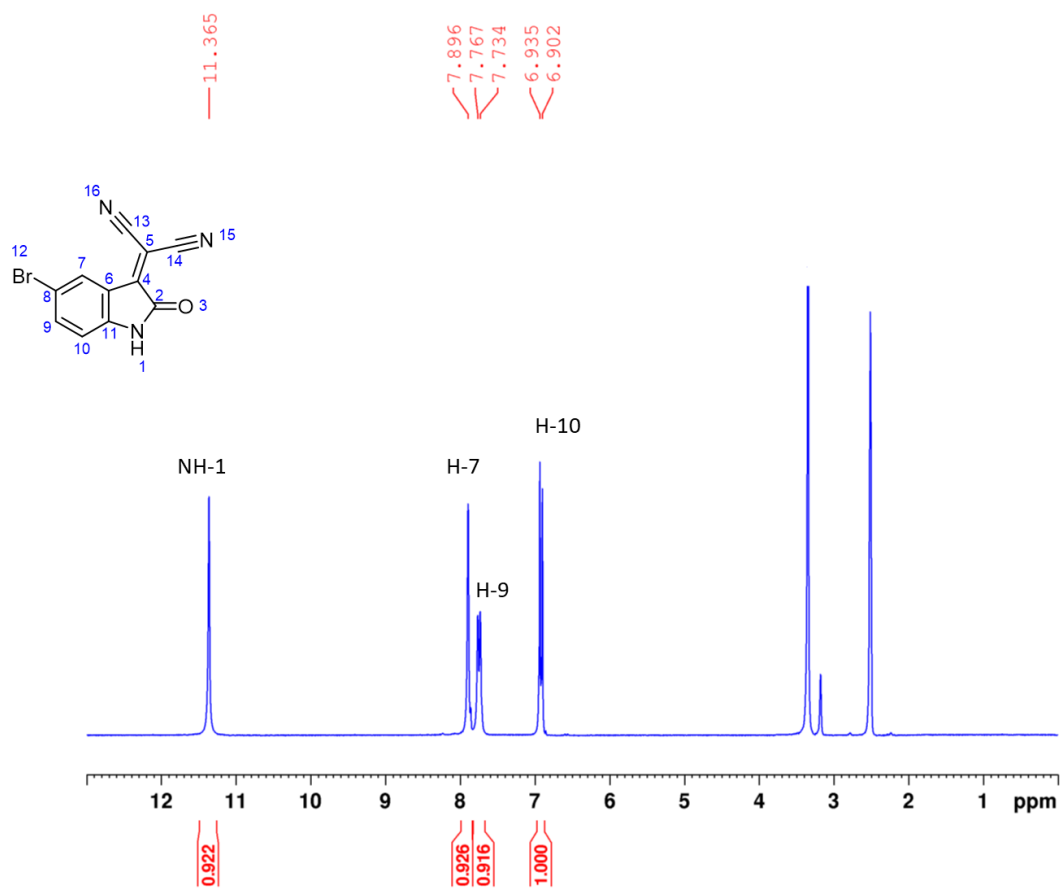
**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO):**  $\delta$  11.11 (s, 1H, NH-1), 7.88 (dd,  $J$  = 8.2, 1.9 Hz, 1H, H-9), 7.75 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 1H, H-7), 6.76 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H, H-10).



**Εικόνα 135.** Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 17 σε διαλύτη DMSO- $d_6$  (101 MHz, 25 °C).

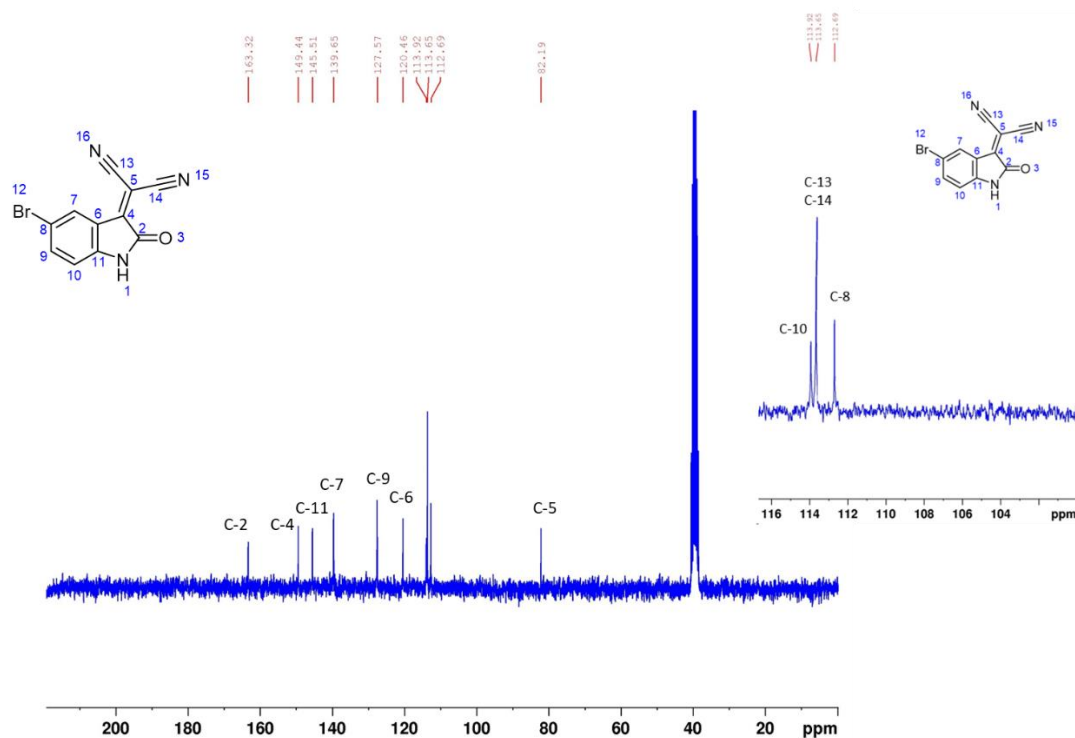
**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO):**  $\delta$  163.40 (C-2), 158.66 (C-4), 149.95 (C-11), 145.78 (C-7), 132.40 (C-9), 121.71 (C-6), 119.89 (C-10), 114.61 (C-13 και C-14), 112.56 (C-8), 85.39 (C-5).

## Ένωση 18



Εικόνα 136. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της ένωσης 18 σε διαλύτη DMSO-d<sup>6</sup> (400 MHz, 25 °C).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO): δ 11.36 (s, 1H), 7.90 (s, 1H, H-7), 7.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-9), 6.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-10).



**Εικόνα 137.** Φάσμα <sup>13</sup>C NMR της ένωσης 18 σε διαλύτη DMSO-d<sup>6</sup> (101 MHz, 25 °C).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO):** δ 163.32 (C-2), 149.44 (C-4), 145.52 (C-11), 139.65 (C-7), 127.58 (C-9), 120.46 (C-6), 113.93 (C-10), 113.66 (C-13 και C-14), 112.69 (C-8), 82.19 (C-5).

### 5.1.5 Βιολογική αξιολόγηση των πέντε πρόδρομων αναλόγων της Ισατίνης και των πέντε νέων μορίων, μετά την ενσωμάτωση της νιτριλο-ομάδας, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν την Nsp15

#### 5.1.5.1 Έκφραση και καθαρισμός της πρωτεΐνης Nsp15

Έχοντας λοιπόν διαθέσιμες τόσο τις πρόδρομες όσο και τις τροποποιημένες ενώσεις, πραγματοποιήθηκαν βιολογικά πειράματα, ώστε να διερευνηθεί το βιολογικό τους προφίλ. Συγκεκριμένα, για να διερευνηθεί η δυνατότητα αυτών των ενώσεων να αναστέλλουν την καταλυτική δραστηριότητα της Nsp15 του SARS-CoV-2, εκφράσαμε την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, ως πρωτεΐνη σύντηξης GST (Glutathione-S-transferase) στο E.coli και καθαρίσαμε την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Nsp15, χρησιμοποιώντας χρωματογραφία συγγένειας GST.

Συγκεκριμένα, η ανασυνδυασμένη Nsp15 παρήχθη ως πρωτεΐνη σύντηξης με His-GST από το πλασμίδιο έκφρασης pETM33\_Nsp15 (Addgene plasmid # 156481) σε κύτταρα E. coli BL21 (DE3) pLysS Star™, που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο LB (Lysogeny Broth) συμπληρωμένο με 50 μg/mL καναμυκίνη. Η μετασηματισμένη κυτταρική καλλιέργεια αναπτύχθηκε στους 37°C έως ότου η οπτική πυκνότητα (600 nm) έφθασε στο 0,7 και στη συνέχεια ψύχθηκε στους 4°C έως ότου η θερμοκρασία της έφθασε στους 18°C. Στη συνέχεια, η επαγωγή της βακτηριακής καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 1 mM ισοπροπυλ β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδης (IPTG) και επώαστηκε για 5 ώρες στους 18°C. Τα βακτηριακά κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στα 7,000 g για 5 λεπτά και τα σφαιρίδια αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Τα βακτηριακά κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε ψυχρό ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 6 mM

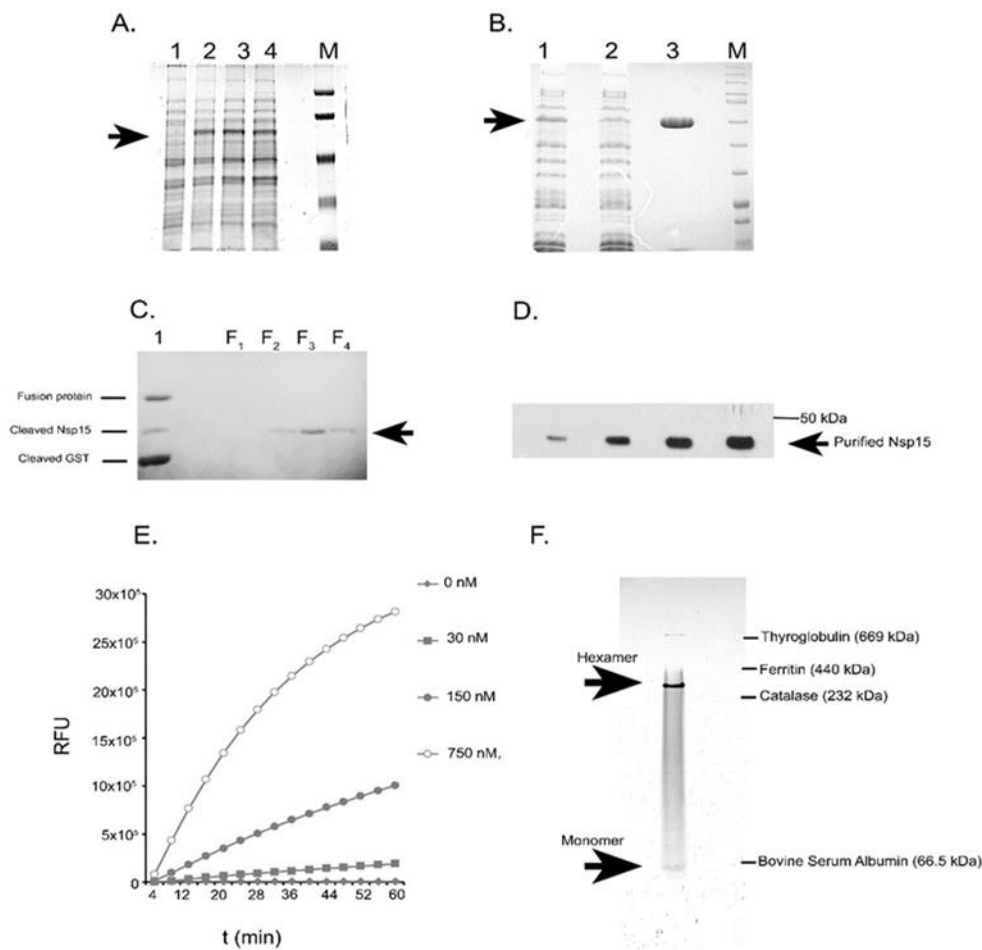


$\beta$ -ME, 0,5 mM PMSF), ώστε να γίνει λύση, και κατεργάστηκαν περαιτέρω με υπερήχους σε παλμούς των 3 δευτερολέπτων ανά 9 δευτερόλεπτα για χρόνο 20 λεπτά. Το προϊόν λύσης φυγοκεντρήθηκε στα 15.000 g για 15 λεπτά στους 4 °C και το υπερκείμενο διηθήθηκε μέσω φίλτρου 0,22  $\mu$ m. Το διαυγασμένο εκχύλισμα πρωτεΐνης τοποθετήθηκε σε στήλη Glutathione Sepharose 4B, εξισορροπημένη σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης χωρίς PMSF, και η στήλη εκπλύθηκε αρχικά με ένα ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο περιείχε 50 mM HEPES pH 7,5, 300 mM NaCl, 6 mM  $\beta$ -ME και στη συνέχεια με ρυθμιστικό διάλυμα διάσπασης (50 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 6 mM  $\beta$ -ME, 10% γλυκερίνη). Για να αποκοπεί η ετικέτα His-GST (His-GST tag, πεπτιδικές αλληλουχίες, που προσαρτώνται σε πρωτεΐνες έτσι ώστε να μπορούν να καθαριστούν χρησιμοποιώντας μια τεχνική συγγένειας) από την πρωτεΐνη σύντηξης που δεσμεύτηκε στη στήλη, το ρυθμιστικό διάλυμα της στήλης αντικαταστάθηκε, με ισοδύναμο όγκο, ρυθμιστικό διάλυμα διάσπασης, που περιείχε περίπου 25  $\mu$ g πρωτεάσης HRV 3C (SAE0045, Sigma-Aldrich) και η στήλη επώαστηκε σε ψυχρό θάλαμο για όλη τη διάρκεια της νύχτας. Η πρωτεΐνη Nsp15 εκλούστηκε από τη στήλη με ρυθμιστικό διάλυμα διάσπασης, και τα κλάσματα, τα οποία περιείχαν την καθαρισμένη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, συλλέχθηκαν και συνενώθηκαν. Η απομάκρυνση της πρωτεάσης επιτεύχθηκε με την προσθήκη μικρής ποσότητας πρωτεϊνικής ρητίνης Ni-TED (Macherey-Nagel), ακολουθούμενη από ήπια ανάδευση για 30 λεπτά στους 4°C και φυγοκέντρηση για τη συλλογή του υπερκείμενου. Η καθαρισμένη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Nsp15 αποθηκεύτηκε τελικά σε κλάσματα σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα, που περιείχε 25 mM HEPES pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 6 mM  $\beta$ -ME και 50% γλυκερίνη στους -20°C.

Η πρωτεολυτική πέψη, εντός στήλης, της πρωτεΐνης σύντηξης με την πρωτεάση HRV 3C έδωσε εξαιρετικά καθαρή πρωτεΐνη Nsp15, όπως επιβεβαιώθηκε και από αναλύσεις SDS-PAGE και Western blot.

#### 5.1.5.2 Επιβεβαίωση της ενδονουκλεολυτικής δράσης και προσδιορισμός της ανασταλτικής δράσης των αναλόγων της Ισατίνης

Εφόσον, η Nsp15 διασπά κατά προτίμηση υποστρώματα που περιέχουν ουριδίνη, η ενδονουκλεολυτική δράση του καθαρισμένου ενζύμου επιβεβαιώθηκε με ένα πείραμα, που βασίζεται στο φαινόμενο FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), και χρησιμοποιεί ένα συνθετικό υπόστρωμα πέντε νουκλεοτιδίων, που αποτελείται από μια απλή ουριδίνη (rU), η οποία πλαισιώνεται από δύο δεοξυ-αδενοσίνες (dA). Η διάσπαση του υποστρώματος από την ανασυνδυασμένη Nsp15 παρακολουθήθηκε με την προσθήκη ενός 5' FAM φθοροφόρου και 3' Iowa Black FQ αποσβέστη στα απέναντι άκρα του υποστρώματος. Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, η παρουσία Mn<sup>2+</sup> σε ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης (συμπληρωμένο με 5 mM MnCl<sub>2</sub>) ήταν απαραίτητη για την καταλυτική δράση του καθαρισμένου ενζύμου. Προηγούμενες αναφορές έχουν δείξει ότι, ο ολιγομερισμός της Nsp15 είναι απαραίτητος για την καταλυτική δράση. Εν συντομία, το συνθετικό υπόστρωμα 5'-6-FAM-AArUAA-Iowa Black FQ-3', που αγοράστηκε από την Integrated DNA Technologies Inc (Coralville, Iowa) σε σταθερή συγκέντρωση 0,5  $\mu$ M, επώαστηκε στους 37°C με διαφορετικές ποσότητες Nsp15 (0, 30, 150, 750 nM) και 8 μονάδες αναστολέα RNAάσης από ανθρώπινο πλακούντα (New England BioLabs) σε ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο περιέχει 20 mM HEPES pH 7,5, 75 mM NaCl, 5 mM MnCl<sub>2</sub> και 5 mM  $\beta$ -ME, σε ένα τελικό όγκο ανάλυσης 20  $\mu$ L. Ο φθορισμός παρακολουθούνταν κάθε 2 λεπτά για 1 ώρα.



**Εικόνα 138.** Καθαρισμός της ενεργούς ανασυνδυασμένης Nsp15 του SARS-CoV-2. Α) Έκφραση της Nsp15 σε *E.coli*. Τα συνολικά εκχυλίσματα από ισοδύναμες ποσότητες *E.coli*, που φιλοξενούν το πλασμίδιο έκφρασης pETM33\_Nsp15 αναλύθηκαν με SDS-PAGE και το πήκτωμα χρωματίστηκε με Coomassie brilliant blue R250. Η λωρίδα 1 δείχνει την πρωτεϊνική ανάλυση πριν από την επαγωγή IPTG, ενώ η λωρίδα 2, 3 και 4 δείχνει την πρωτεϊνική ανάλυση προϊόντων λύσης στις 2,3 και 4 ώρες μετά την επαγωγή της IPTG. Η Nsp15 εκφράζεται ως πρωτεΐνη σύντηξης GST 67 kDa (βέλος). Οι πρωτεΐνες-δείκτες γνωστού μοριακού βάρους παρουσιάζονται στη λωρίδα M. Β) Καθαρισμός πρωτεΐνης σύντηξης με χρωματογραφία συγγένειας GST. Λωρίδα 1 (Προϊόν λύσης πρωτεΐνης που προέκυψε 4 ώρες μετά την επαγωγή IPTG), λωρίδα 2 (ροή), λωρίδα 3 (διαλύτης έκλουσης), M (πρωτεϊνικοί δείκτες). Το βέλος δείχνει το μοριακό βάρος της εκλουόμενης πρωτεΐνης σύντηξης. C) Πρωτεολυτική πέψη πρωτεΐνης σύντηξης και καθαρισμός Nsp15. Λωρίδα 1: Πέψη σε στήλη πρωτεΐνης σύντηξης με πρωτεάση HRV 3C. Οι λωρίδες F1-4 υποδεικνύουν κλάσματα καθαρισμένης πρωτεΐνης Nsp15. Το βέλος δείχνει το μοριακό βάρος της απελευθερωμένης πρωτεΐνης Nsp15. D) Ανάλυση Western blot των κλασμάτων της καθαρισμένης Nsp15. E) Δοκιμασία επιβεβαίωσης ενδονουκλεολυτικής δράσης της Nsp15, βασισμένη στο FRET και χρονικά εξαρτώμενη διάσπαση του ολιγονουκλεοτιδίου 5'-6-FAM-AArUAA-Iowa Black FQ-3'. Η ενζυμική δράση της ανασυνδυασμένης Nsp15 αξιολογήθηκε, επωάζοντας 0,5  $\mu$ M του φθορίζοντος υποστρώματος με διαφορετικές συγκεντρώσεις (0 nM, 30 nM, 150 nM και 750 nM) της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, στους 37°C, για 60 λεπτά. RFU: Σχετικές μονάδες φθορισμού. F) Ηλεκτροφόρηση γέλης της καθαρισμένης ενεργούς Nsp15, η οποία υποδεικνύει το σχηματισμένο εξαμερές σύμπλοκο και το κλάσμα του μονομερούς.

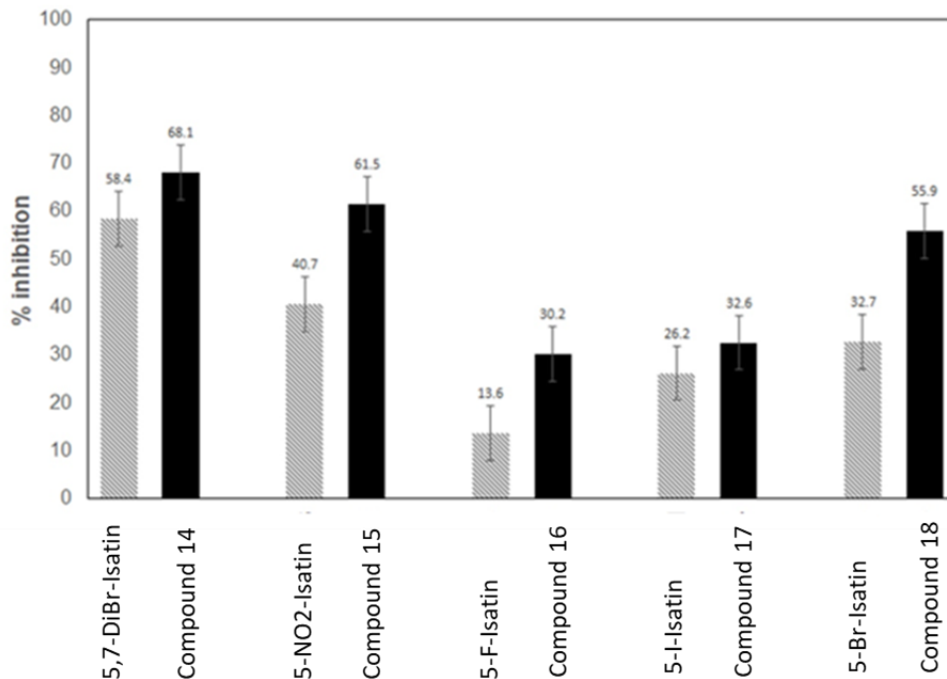
Στη συνέχεια, τα πέντε αρχικά ανάλογα της Ισατίνης (5,7-διβρωμοϊνδολινο-2,3-διόνη, 5-νιτροϊνδολινο-2,3-διόνη, 5-φθοροϊνδολινο-2,3-διόνη, 5-ιοδοϊνδολινο-2,3-διόνη, 5-βρωμοϊνδολινο-2,3-διόνη) και τα παράγωγά τους μετά την προσθήκη της ομάδας νιτριλίου (Ενώσεις 14-18) δοκιμάστηκαν σχετικά με την ικανότητά τους να αναστέλλουν την καταλυτική δράση της καθαρισμένης ανασυνδυασμένης Nsp15, με δοκιμασία FRET, in vitro. Ο έλεγχος των ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε συγκέντρωση 100 μΜ.

Συγκεκριμένα, οι δοκιμές ανασταλτικής δράσης των ενώσεων πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιώντας 150 nM Nsp15 και 2 μL από τις, υπό δοκιμή, ενώσεις διαλυμένες σε DMSO. Ως αντίδραση control στη θέση του αναστολέα προστέθηκε DMSO. Για τον υπολογισμό της τιμής  $IC_{50}$  (συγκέντρωση στην οποία έχει γίνει αναστολή του 50% της δράσης του ενζύμου) αρχικά υπολογίστηκε η κλίση της αντίδρασης παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων (0–1000 μΜ) κάθε ένωσης για τα πρώτα 30 λεπτά των αντιδράσεων με γραμμική παλινδρόμηση. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν οι κλίσεις για τον υπολογισμό του ποσοστού δραστηριότητας σε σχέση με την κλίση, που ελήφθη από την αντίδραση, χωρίς την παρουσία αναστολέα. Πραγματοποιήθηκαν τρεις ανεξάρτητες αναλύσεις για κάθε συγκέντρωση αναστολέα, ώστε να προσδιοριστεί η μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα. Για κάθε ένωση, το ποσοστό δραστηριότητας σε κάθε συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για την εκτίμηση της τιμής  $IC_{50}$  με χρήση του προγράμματος GraphPad Prism.

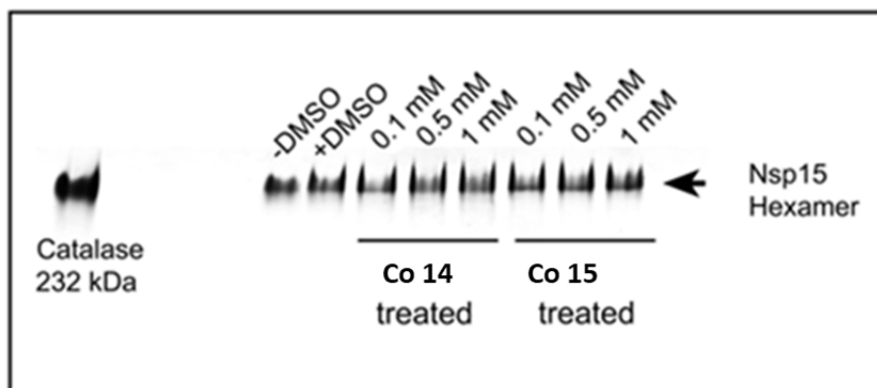
Όπως παρουσιάζεται και στην **Εικόνα 139**, τα αρχικά ανάλογα Ισατίνης, 5,7-διβρωμοϊσατίνη και 5-νιτροϊσατίνη, καθώς επίσης και τα παράγωγά τους (Ένωση 14 και Ένωση 15 αντίστοιχα) εμφάνισαν τον υψηλότερο βαθμό αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου, μεταξύ των διαφορετικών ενώσεων που μελετήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία 100 μΜ 5,7-διβρωμοϊσατίνης και 5-νιτροϊσατίνης, η Nsp15 διατήρησε μόνο το 42% και 60% της δραστηριότητάς της, αντίστοιχα, ενώ η ίδια συγκέντρωση των νέων αναλόγων (Ένωση 14 και Ένωση 15) προκάλεσε ισχυρότερη αναστολή, δεδομένου ότι η Nsp15 διατήρησε μονάχα το 32% και 39% της δραστηριότητάς της αντίστοιχα. Αυτά τα ευρήματα φανέρωσαν πως οι συγκεκριμένες ετεροκυκλικές ενώσεις, που βασίζονται στο μόριο της Ισατίνης, είναι ικανές να αναστείλουν την ενδονουκλεολυτική δράση της Nsp15. Επιπρόσθετα, σύγκριση των αποτελεσμάτων όσον αφορά τα πρόδρομα και τα τροποποιημένα μόρια, επιβεβαίωσε πως η ενσωμάτωση της νιτριλο-ομάδας στα μόρια 5,7-διβρωμοϊσατίνη και 5-νιτροϊσατίνη, οδήγησε σε ενώσεις, οι οποίες είναι πιο αποτελεσματικοί αναστολείς της Nsp15, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία και με τους in silico υπολογισμούς, καταδεικνύοντας για ακόμα μία φορά τη σημαντική επίδραση της ομάδας αυτής.

Για να εξετάσουμε την πιθανότητα αλλοστερικού φαινομένου και αποσταθεροποίησης του συμπλόκου της Nsp15 από τα μόρια αυτά, γεγονός που θα σήμαινε την διαταραχή του ολιγομερισμού της πρωτεΐνης, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη υποβλήθηκε σε προεπεξεργασία με διαφορετικές συγκεντρώσεις των ενώσεων και τα μείγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση Native-PAGE. Αποτέλεσμα αυτής της ανάλυσης ήταν, πως τα ανάλογα της Ισατίνης δεν έχουν κάποια επίδραση στον εξαμερισμό της Nsp15.

A

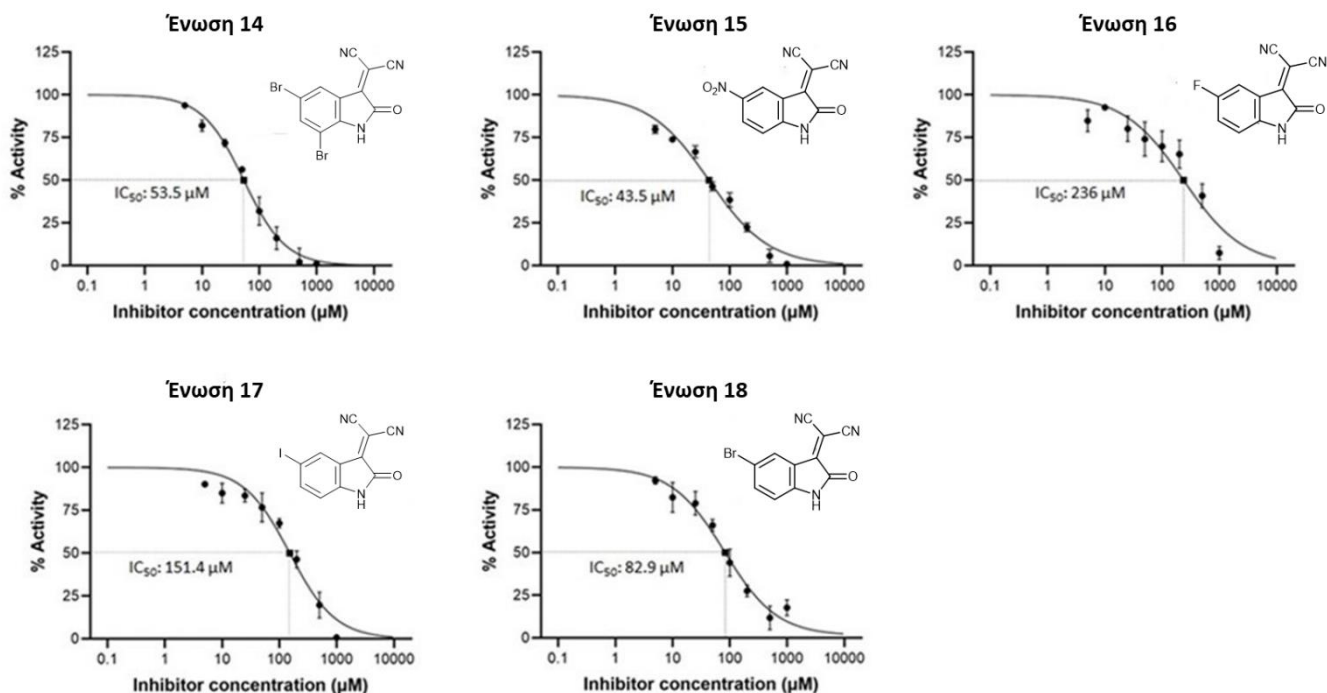


B



**Εικόνα 139.** Αναστολή της *Nsp15* από ανάλογα της Ισατίνης. Α) Σύγκριση της ανασταλτικής δράσης των ενώσεων 14-18 έναντι των πρόδρομων μορίων αυτών. Η αξιολόγηση, του ποσοστού αναστολής της δραστηριότητας της *Nsp15*, των ενώσεων αυτών έγινε σε συγκέντρωση 100  $\mu\text{M}$ . Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα για κάθε αναστολέα, που δοκιμάστηκε για τον προσδιορισμό του μέσου και του τυπικού σφάλματος. Β) Ηλεκτροφόρηση γέλης της ενεργούς καθαρισμένης *Nsp15*, η οποία υποβλήθηκε σε επεξεργασία με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των ενώσεων 14 και 15. Το βέλος υποδεικνύει τη θέση του εξαμερούς *Nsp15*. Ως δείκτης χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο καταλάση.

Σε ένα επόμενο βήμα, οι ενώσεις 14-18 υποβλήθηκαν σε ένα πείραμα FRET σε διαφορετικές συγκεντρώσεις με σκοπό να προσδιοριστούν οι τιμές  $IC_{50}$ . Οι ενώσεις 14 και 15 κατάφεραν να επιδείξουν 50% αναστολή της δραστηριότητας της *Nsp15* σε συγκεντρώσεις εντός του εύρους 40-55  $\mu\text{M}$  και ως εκ τούτου χαρακτηρίστηκαν ως τα παράγωγα με την καλύτερη ανασταλτική δράση, αφού οι ενώσεις 16,17 και 18 απέτυχαν να προκαλέσουν αναστολή 50% σε συγκεντρώσεις έως και 80  $\mu\text{M}$ . Πιο συγκεκριμένα, η ένωση 15 παρουσίασε την υψηλότερη ισχύ με τιμή  $IC_{50}$  ίση με 43,5  $\mu\text{M}$ , ενώ η ένωση 14 παρουσίασε σχεδόν παρόμοια ισχύ με τιμή  $IC_{50}$  ίση με 53,5  $\mu\text{M}$ .



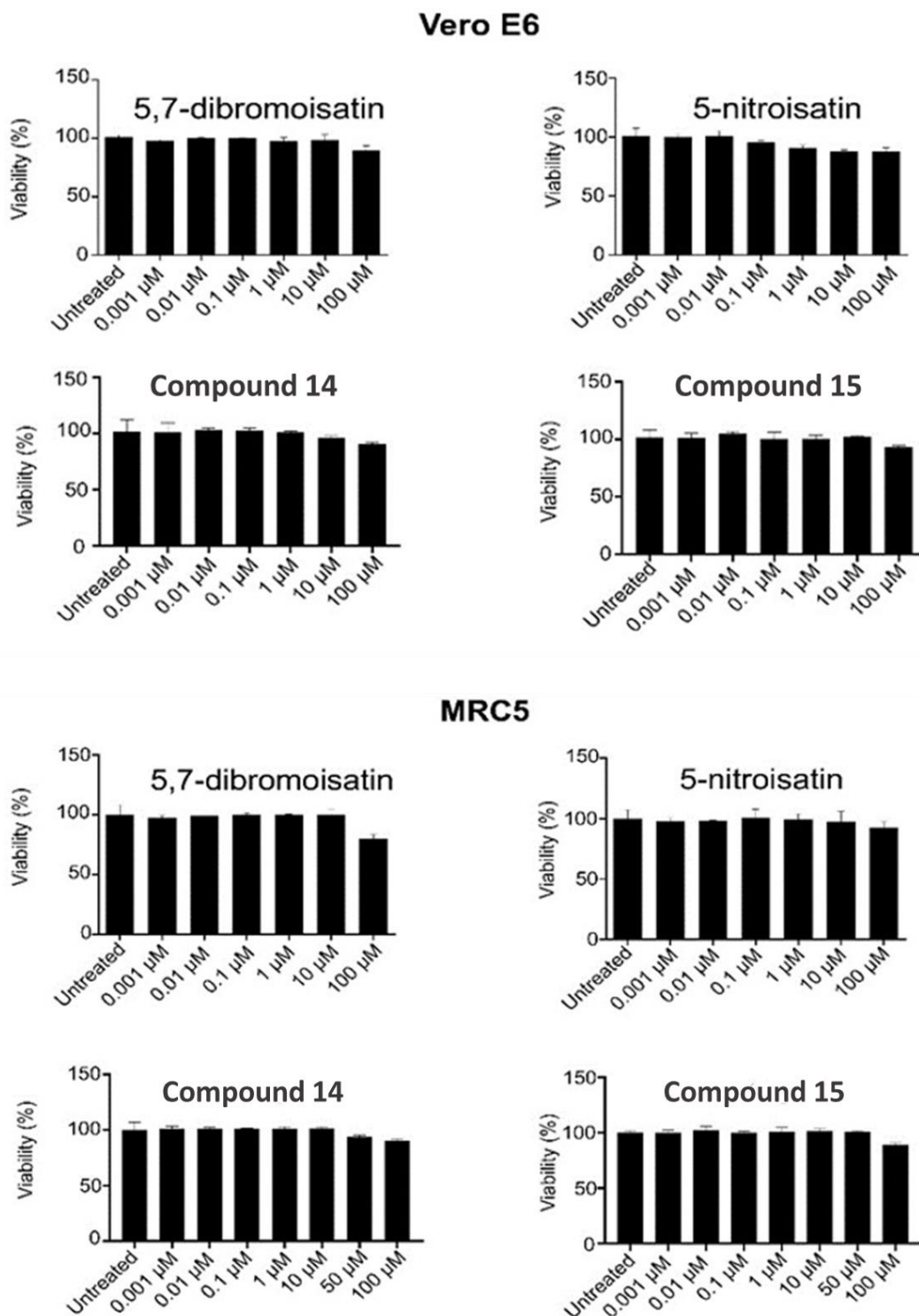
**Εικόνα 140.** Καμπύλες απόκρισης σε διαφορετικές δόσεις των αναστολέων 14-18. Τιτλοδότηση και προσδιορισμός της τιμής  $IC_{50}$  για κάθε ένωση.

### 5.1.5.3 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας των αναστολέων της Nsp15

Από τις παραπάνω μελέτες κατέστη προφανές ότι τόσο τα πρόδρομα ανάλογα της Ισατίνης, όσο και τα μόρια που προέκυψαν μετά την ενσωμάτωση της νιτριλο-ομάδας, εμφανίζουν βιολογική δράση έναντι της Nsp15. Για να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω αυτές οι ενώσεις ως πιθανοί αντιικοί παράγοντες έναντι του SARS-CoV-2, είναι σημαντικό να αξιολογηθεί προκλινικά το προφίλ τοξικότητάς τους, καθώς είναι απαραίτητο να μην εμφανίζουν τοξικότητα έναντι των κυττάρων του ξενιστή. Για τον σκοπό αυτό, αξιολογήθηκε η κυτταροτοξικότητα των πρόδρομων μορίων, 5,7-διβρωμοϊσατίνη και 5-νιτροϊσατίνη, και των αντίστοιχων παραγώγων τους (Ένωση 14 και Ένωση 15, οι οποίες έδωσαν τις καλύτερες τιμές  $IC_{50}$ ) σε VeroE6 (επιθηλιακά κύτταρα νεφρού πράσινου αφρικανικού πιθήκου) και MRC5 (ανθρώπινοι εμβρυϊκοί πνευμονικοί ινοβλάστες) κυτταρικές σειρές με αναλύσεις βιωσιμότητας κυττάρων MTT, χρησιμοποιώντας αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0,001-100  $\mu\text{M}$ ) αυτών των ενώσεων.

Ειδικότερα, όλες οι κυτταρικές σειρές αγοράστηκαν αρχικά από την ATCC. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε μέσο Dulbecco's Modified Eagle's (Sigma-Aldrich, cat. D6429) συμπληρωμένο με 10% εμβρυϊκό ορό βοοειδών, απενεργοποιημένο με θέρμανση (Biosera, cat. FB-1001/500) και πενικιλίνη (100 μονάδες/ml)/ στρεπτομικίνη (100  $\mu\text{g/ml}$ , Thermo Fischer Scientific, cat. 15140122) στους 37°C, παρουσία 5%  $\text{CO}_2$ . Για τις δοκιμές βιωσιμότητας των κυττάρων, τα κύτταρα απλώθηκαν σε 6-10  $\times 10^3$  ανά φρεάτιο σε πλάκες 48 φρεατίων και επώαστηκαν με πλήρες μέσο DMEM, το οποίο περιέχει διαφορετικές συγκεντρώσεις ενώσεων, όπως υποδεικνύεται στο αντίστοιχο υπόμνημα της **Εικόνας 141**. Οι δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την τυπική χρωματομετρική δοκιμασία MTT (Sigma, cat. M5655) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι μετρήσεις αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το GraphPad Prism v6.

Συμπερασματικά, οι αναλύσεις αποκάλυψαν ότι τόσο τα πρόδρομα μόρια όσο και τα παράγωγά τους έχουν παρόμοιο προφίλ όσον αφορά την επίδρασή τους στη βιωσιμότητα των κυττάρων, παρουσιάζοντας χαμηλά επίπεδα κυτταροτοξικότητας μονάχα στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (100  $\mu\text{M}$ ). Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται και στην **Εικόνα 141**.



**Εικόνα 141.** Προφίλ τοξικότητας των ενώσεων 14 και 15, καθώς επίσης και των πρόδρομων μορίων τους. Δοκιμασίες βιωσιμότητας MTT σε κυτταρικές σειρές MRC5 και Vero E6. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν μέσο όρο  $\pm$  SEM από τρία πειράματα.

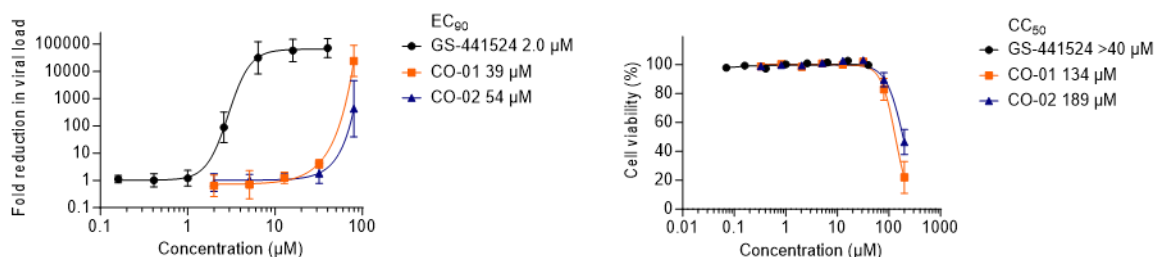
#### 5.1.5.4 Μελέτη της δραστικότητας των ενώσεων 14 και 15 έναντι του SARS-CoV-2 σε κυτταρική καλλιέργεια

Προκειμένου να αξιολογηθεί η δραστικότητα των ενώσεων 14 και 15 έναντι του ιού SARS-CoV-2, επιλέχθηκε ένα μοντέλο καλλιέργειας επιθηλιακών κυττάρων ανθρώπινου πνεύμονα. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα A549 (ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα από αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα), τα οποία ήταν επιμολυσμένα με το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης II (ACE2) και με το ένζυμο TMPRSS2 (Transmembrane Protease Serine 2), τα οποία αναφέρονται ως A549-AT. Ενώ το ACE2 χρησιμεύει ως υποδοχέας του ιού, η πρωτεάση TMPRSS2 ενεργοποιεί την πρωτεϊνική ακίδα του ιού για την είσοδό του στο κύτταρο. Ο προσδιορισμός της μείωσης του ιικού φορτίου διεξήχθη, μολύνοντας κύτταρα A549-AT με την μετάλλαξη SARS-CoV-2 omicron BF.7 και επωάζοντάς τα για τρεις ημέρες μετά από διαδοχικές αραιώσεις των ενώσεων. Ως μέσο χρησιμοποιήθηκε το DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) συμπληρωμένο με 10% FBS, 2 mM L-γλουταμίνη, 100 µg/ml υγρομυκίνη και 0,5 µg/ml πουρομυκίνη.

Στη συνέχεια, ο αριθμός αντιγράφων ιικού RNA στο υπερκείμενο διάλυμα, το οποίο συλλέχθηκε από τις μολυσμένες πλάκες, προσδιορίστηκε με ανάλυση qRT-PCR. Για να πραγματοποιηθεί λύση των σωματιδίων του ιού, προστέθηκαν 2 µl δείγματος σε 11 µl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης των κυττάρων σε cDNA II (AM8723, Thermo Fisher Scientific) και ακολούθησε θέρμανση στους 75°C για 10 λεπτά. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ο αριθμός μείωσης των αντιγράφων του ιικού RNA, συγκρίνοντας τις ενώσεις οι οποίες εκτέθηκαν στον ιό, με την ένωση control, η οποία κατεργάστηκε χωρίς την παρουσία ιού. Τα αποτελέσματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή καμπυλών δόσης-απόκρισης (μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων, Graphpad Prism), καθώς επίσης και για τον προσδιορισμό της τιμής EC90 (συγκέντρωση της ένωσης που προκαλεί μείωση στο ιικό φορτίο 10 φορές).

Παράλληλα, η κυτταροτοξικότητα της ένωσης υπολογίστηκε σε καλλιέργειες μολυσμένες με ψευδή τρόπο, οι οποίες επίσης εκτέθηκαν στις ενώσεις 14 και 15 για τρεις ημέρες και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε δοκιμασία βιωσιμότητας κυττάρων MTS. Το GS-441524, η νουκλεοσιδική μορφή της ρεμδεσιβίρης, συμπεριλήφθηκε ως η ένωση αναφοράς. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως % βιωσιμότητα σε σύγκριση με το control και σχεδιάστηκαν σε καμπύλες δόσης-απόκρισης (μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων, έκδοση λογισμικού Graphpad Prism έκδοση 10) για την εκτίμηση των τιμών CC50. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 142**, η ένωση 15 (κωδικό όνομα: CO-02) πέτυχε μείωση του ιικού φορτίου κατά **425 φορές στα 80 µM**, ενώ αντίστοιχα η ένωση 14 (CO-01) μείωσε το ιικό φορτίο κατά σχεδόν **68.000 φορές** στην ίδια συγκέντρωση, τιμή η οποία είναι συγκρίσιμη με την μείωση που προκλήθηκε από το GS-441524 στα 40 µM (72.000 φορές). Επίσης, επιβεβαιώνεται πως οι ενώσεις εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα σε συγκεντρώσεις αρκετά υψηλότερες από αυτές που απαιτούνται για την αντιική δράση.





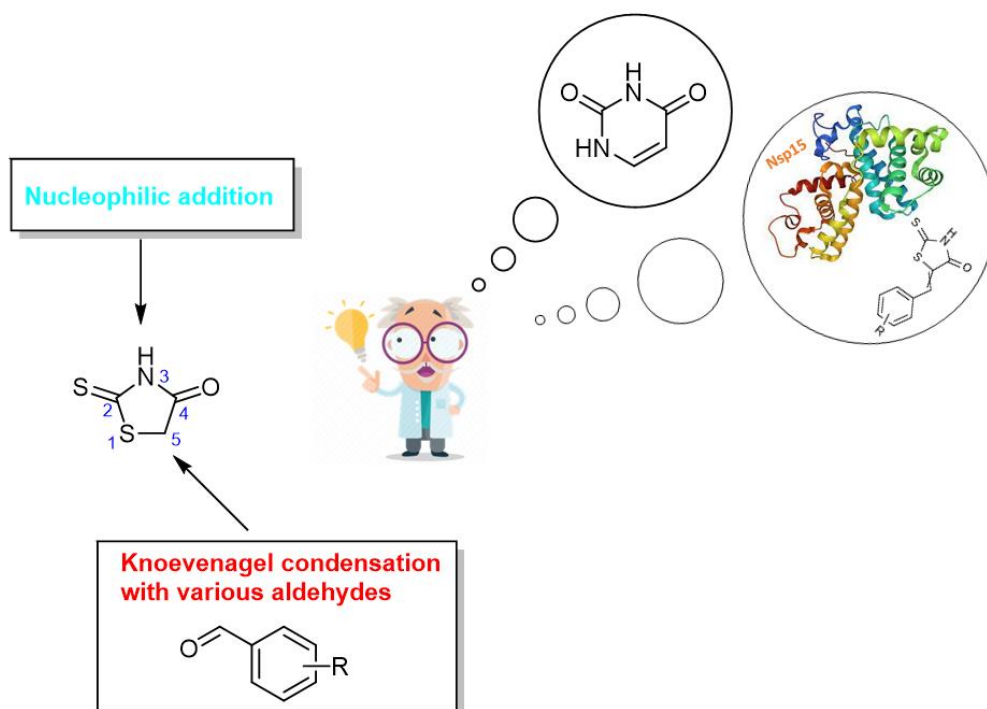
**Εικόνα 142.** Δραστικότητα έναντι του SARS-CoV-2 και κυτταροτοξικότητα σε ανθρώπινα κύτταρα A549-AT, για τις ενώσεις **14 (CO-01)** και **15 (CO-02)**. **Αριστερά:** αριθμός μείωσης του ιικού φορτίου στο υπερκείμενο διάλυμα 3 μέρες μετά τη μόλυνση. EC<sub>90</sub>: συγκέντρωση ένωσης για να επιτευχθεί 10πλάσια μείωση του αριθμού των αντιγράφων ιικού RNA, με βάση την ανάλυση qRT-PCR. **Δεξιά:** κυτταροτοξικότητα ένωσης σε ψευδο-μολυσμένα κύτταρα. CC<sub>50</sub>: 50% κυτταροτοξική συγκέντρωση με βάση τον προσδιορισμό βιωσιμότητας των κυττάρων MTS. Τα σημεία δεδομένων είναι ο μέσος όρος ± SEM τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Προσαρμογή καμπύλης με βάση μη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism.

## 5.2 Σύνθεση μιας δεύτερης γενιάς πιθανών αναστολέων της πρωτεΐνης Nsp15

### 5.2.1 Ορθολογικός σχεδιασμός

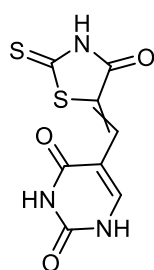
Εφόσον είδαμε ότι ετεροκυκλικές ενώσεις, όπως η Ισατίνη και τα παράγωγά της, εμφανίζουν ανασταλτική δράση έναντι της Nsp15, αποφασίσαμε να επικεντρωθούμε και στην ανάπτυξη μιας δεύτερης γενιάς πιθανών αναστολέων, βασισμένων σε μία άλλη ετεροκυκλική ένωση, τη ροδανίνη, ή αλλιώς 2-θειοξοθειαζολιδιν-4-όνη. Υπάρχει μια πληθώρα βιβλιογραφικών αναφορών, που καταδεικνύει ότι ενώσεις που βασίζονται σε αυτό το μόριο διαθέτουν διάφορες φαρμακολογικές δράσεις, όπως αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές, αντιικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιμυκητιακές. [166][167] Συγκεκριμένα, σχετικά με αντιικές δράσεις, έχουν αναφερθεί ανάλογα της ροδανίνης με ανασταλτική δράση εναντίον του ιού HIV και της ηπατίτιδας C, όπου και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε αναστολή κάποιας μη δομικής πρωτεΐνης. Επηρεασμένοι από αυτό, επεξεργαστήκαμε τη ροδανίνη και παρατηρήσαμε πως η δομή της ένωσης αυτής θα μπορούσε να είναι αρκετά υποσχόμενη για την ανάπτυξη αναστολέων έναντι της Nsp15, καθώς προσομοιάζει με την ουρακίλη. Για αυτόν τον λόγο, υποθέσαμε πως ανάλογα της ροδανίνης θα μπορούσαν να δεσμεύονται στη θέση πρόσδεσης του ενζύμου, αναστέλλοντας συγχρόνως τη δράση του. Η ροδανίνη συνιστά μια πενταμελή ετεροκυκλική ένωση, η οποία φέρει έναν πυρήνα θειαζολιδίνης. Διαθέτει μία ομάδα θειοαιθέρα στη θέση-1, μια ομάδα θειοκαρβονυλίου στη θέση-2, ένα άτομο αζώτου στη θέση-3, μια καρβονυλομάδα στη θέση-4 και μια ομάδα ενεργού μεθυλενίου στη θέση-5. Έχει επίσης ένα ηλεκτρονιόφιλο κέντρο στη θέση-4 και δύο πυρηνόφιλα κέντρα στη θέση-1 και στη θέση-3. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως η θέση-5 είναι ιδανική για αντιδράσεις συμπύκνωσης με μια πληθώρα καρβονυλικών ενώσεων. Σε αυτήν την ιδιότητα βασιστήκαμε για να σχεδιάσουμε μια σειρά αναλόγων με ενδεχόμενη δράση έναντι της Nsp15, μέσω συμπυκνώσεων στη θέση αυτή.





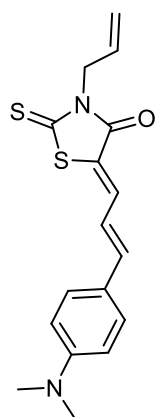
**Εικόνα 142.** Παρουσίαση της πορείας ορθολογικού σχεδιασμού ενώσεων, που στοχεύουν την Nsp15, μέσω αντιδράσεων συμπύκνωσης πάνω στο μόριο της ροδανίνης.

Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες αλδεΐδες για τον σχεδιασμό των μορίων αυτών, τα οποία στη συνέχεια αξιολογήθηκαν μέσω *in silico* πειραμάτων ως προς την ικανότητα πρόσδεσης και αναστολής έναντι της Nsp15. Οι δομές των μορίων αυτών παρουσιάζονται στην **Εικόνα 143**.



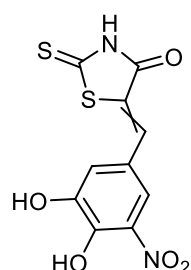
Ένωση 19

CO-17



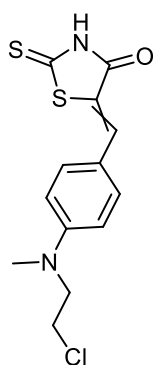
Ένωση 20

CO-19



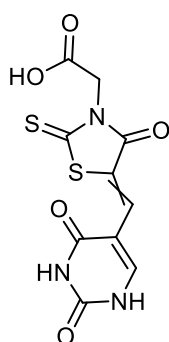
Ένωση 21

CO-21



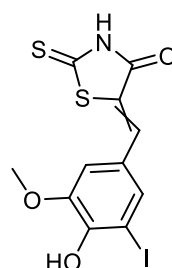
Ένωση 22

CO-25



Ένωση 23

CO-28



Ένωση 24

CO-29

**Εικόνα 143.** Ανάλογα της Ροδανίνης, τα οποία αξιολογήθηκαν ως προς τη δράση τους έναντι της Nsp15.

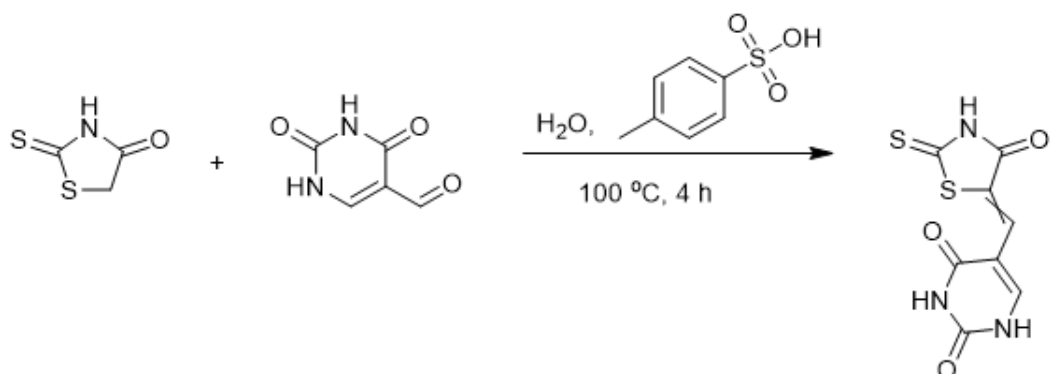
### 5.2.2 Σύνθεση αναλόγων της Ροδανίνης, με πιθανή ανασταλτική δράση έναντι της Nsp15

Όπως προαναφέρθηκε, η ροδανίνη είναι ένα οργανικό μόριο που έχει χρησιμοποιηθεί ποικιλοτρόπως για την ανάπτυξη αρκετών φαρμακοφόρων μορίων. Ιδίως, ανάλογα τα οποία προκύπτουν από αντιδράσεις συμπύκνωσης στη ροδανίνη, αποτελούν κομμάτια διαφόρων φαρμάκων. Συνεπώς, υπάρχουν αρκετές αναφορές συνθετικών μεθόδων στη διεθνή βιβλιογραφία, όσον αφορά τις αντιδράσεις συμπύκνωσης. [168][169] Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι διαφορετικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των αναλόγων της ροδανίνης, καθώς επίσης και οι αντίστοιχες αποδόσεις των εκάστοτε αντιδράσεων.

Συνθήκες αντίδρασης	Ένωση 19	Ένωση 20	Ένωση 21	Ένωση 22	Ένωση 23	Ένωση 24
Ακετονιτρίλιο/Πιπεριδίνη	64%	79%	82%	84%	-	-
Αιθανόλη	66%	81%	74%	82%	82%	-
Αιθανόλη/Πιπεριδίνη	73%	87%	77%	88%	-	81%
Νερό/p-TSA	75%	-	-	-	-	-

**Πίνακας 6.** Σύνοψη των διάφορων συνθηκών, που χρησιμοποιήθηκαν για τις ενώσεις 19-23.

Σύνθεση της ένωσης 19

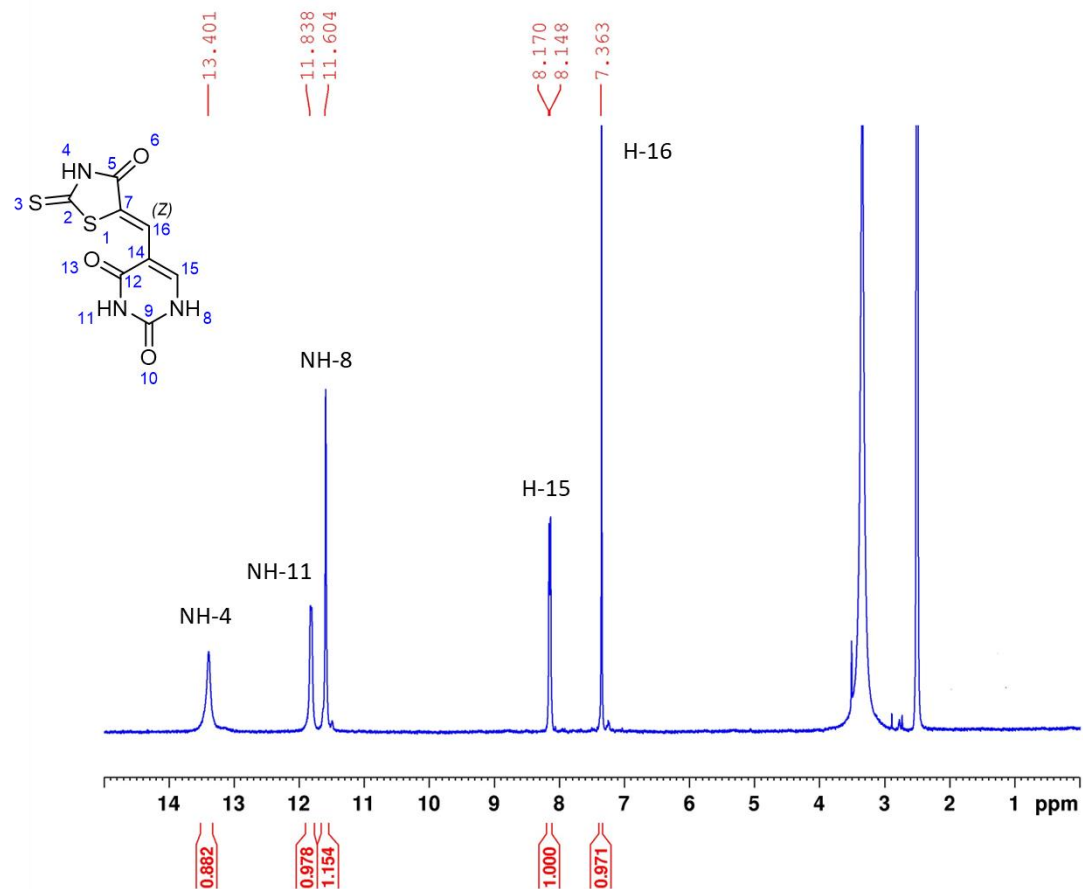


**Εικόνα 144.** Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας της ένωσης 19.

Πειραματική πορεία

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε το αντιδραστήριο 2-θειοξοθειαζολιδιν-4-όνη (100 mg, 0,7508 mmol), καθώς επίσης και η ουρακίλη-5-καρβοξαλδεύδη (105 mg, 0,7508 mmol). Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το  $\text{H}_2\text{O}$ , καθώς επίσης πραγματοποιήθηκε και προσθήκη του p-τολουολοσουλφονικού οξέος (p-TSA) (38 mg, 0,225 mmol). Η αντίδραση έλαβε χώρα υπό ανάδευση και με θέρμανση στους  $100\text{ }^\circ\text{C}$ . Η πορεία της αντίδρασης παρακολούθηθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, TLC, σε σύστημα διαλυτών 5% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο. Παρατηρήθηκε σχεδόν πλήρης κατανάλωση των αντιδρώντων έπειτα από 4 ώρες, καθώς επίσης και σχηματισμός καφέ-πορτοκαλί στερεού. Το μίγμα της αντίδρασης φυγοκεντρήθηκε προς απομόνωση του στερεού, το οποίο συλλέχθηκε και ταυτοποιήθηκε με  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  NMR. Η απόδοση της αντίδρασης μετά την απομόνωση του στερεού ήταν της τάξης του 75% (συλλέχθηκαν 143 mg του επιθυμητού προϊόντος).

Ταυτοποίηση της ένωσης 19



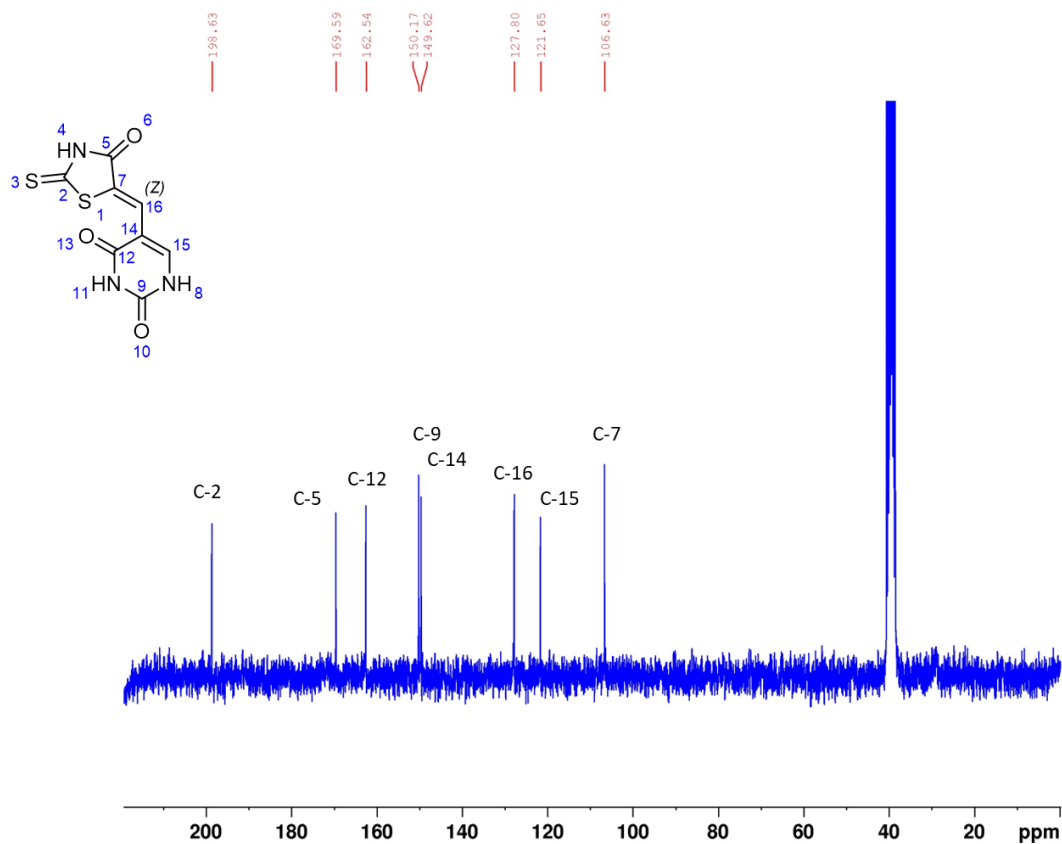
**Εικόνα 145.** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 19 σε διαλύτη  $\text{DMSO}-d^6$  (250 MHz, 25 °C).

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta$  13.39 (s, 1H, NH-4), 11.82 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1H, NH-8), 11.59 (s, 1H, NH-11), 8.15 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H, H-15), 7.35 (s, 1H, H-16).

Παρατηρήσεις:

Όσον αφορά την ισομέρεια, από το φάσμα NMR μπορούμε να κάνουμε την υπόθεση ότι το μόριο υιοθετεί την (Z)-διαμόρφωση, καθώς το εν λόγω ισομερές είναι το θερμοδυναμικά σταθερότερο. Η ύπαρξη αυτού διαπιστώνεται, διότι το βινυλικό H του διπλού δεσμού, που προκύπτει, είναι ελαφρώς απεντοπισμένο στα 7,35 ppm και αυτό συμβαίνει πιθανόν λόγω του ενδομοριακού δεσμού H μεταξύ αυτού και του O-6. Στο (E)-ισομερές δεν υπάρχει η δυνατότητα ανάπτυξης τέτοιας αλληλεπίδρασης, συνεπώς το βινυλικό H αναμένεται να εμφανιστεί σε χαμηλότερες τιμές χημικής μετατόπισης. Βέβαια, δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για αυτό αν δεν πραγματοποιηθούν περαιτέρω πειράματα.

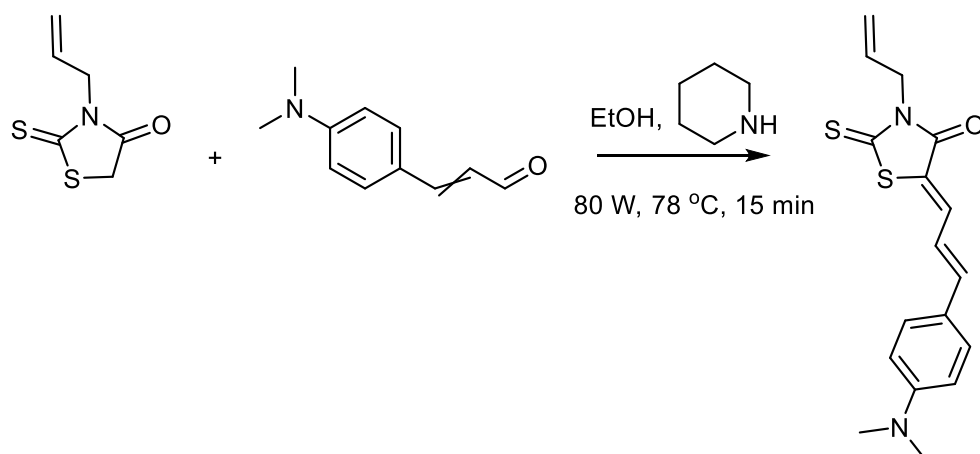
Και για τις επόμενες ενώσεις υπάρχει η πεποίθηση ότι το ισομερές που απομονώθηκε είναι το (Z), το οποίο και από βιβλιογραφικές αναφορές παρουσιάζεται ως το θερμοδυναμικά σταθερό ισομερές.



**Εικόνα 146.** Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 19 σε διαλύτη  $\text{DMSO-}d^6$  (63 MHz,  $25^\circ\text{C}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (63 MHz, DMSO):  $\delta$  198.64 (C-2), 169.59 (C-5), 162.55 (C-12), 150.18 (C-9), 149.62 (C-14), 127.80 (C-16), 121.66 (C-15), 106.63 (C-7).

Σύνθεση της ένωσης 20

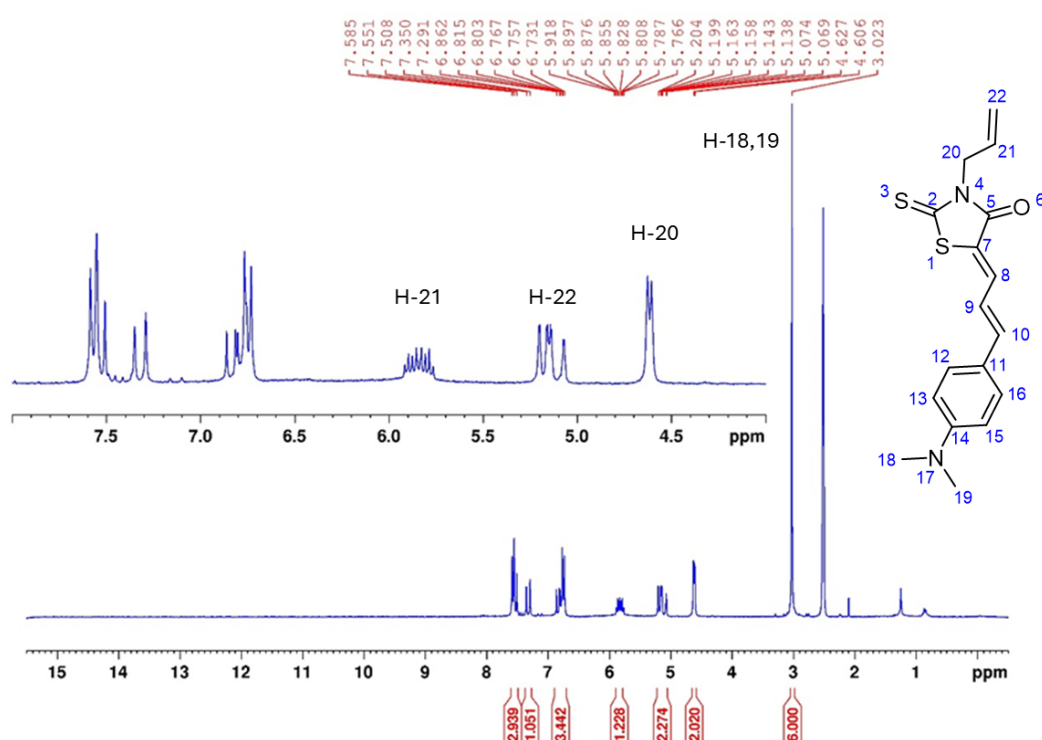


**Εικόνα 147.** Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας της ένωσης 20.

### Πειραματική πορεία

Σε ένα διάλυμα άνυδρης αιθανόλης (4 ml) σε κατάλληλο σωληνάκι, προστέθηκαν 3-αλλυλοροδανίνη (100 mg, 0,577 mmol) και 4-N,N-διμεθυλαμινοκιναμαλδεΰδη (101 mg, 0,577 mmol). Στη συνέχεια, προστέθηκε καταλυτική ποσότητα πιπεριδίνης και το μίγμα της αντίδρασης ακτινοβολήθηκε με 80 Watt στους 78 °C για 15 λεπτά. Η πρόοδος της αντίδρασης παρακολούθηθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) χρησιμοποιώντας ένα σύστημα διαλυτών 2,5% μεθανόλης σε διχλωρομεθάνιο. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (Silica gel) χρησιμοποιώντας διχλωρομεθάνιο ως διαλύτη έκλυσης, οπότε προέκυψαν 166 mg του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση: 87%).

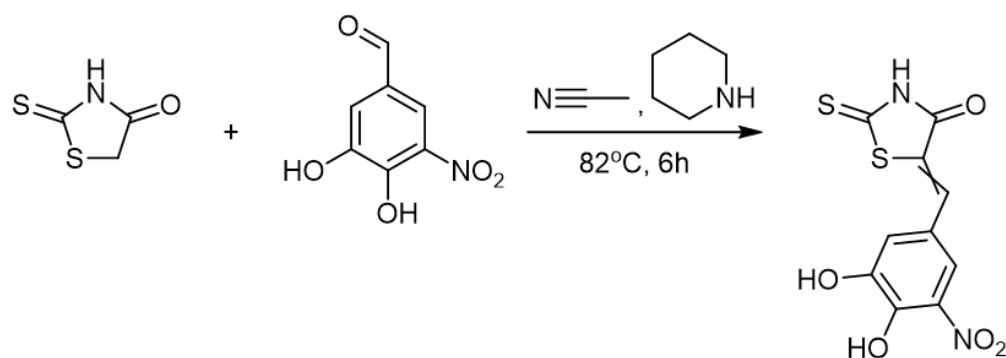
### Ταυτοποίηση της ένωσης 20



**Εικόνα 148.** Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της ένωσης 20 σε διαλύτη DMSO-d<sup>6</sup> (250 MHz, 25 °C).

**<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, DMSO):** δ 7.79 – 7.46 (m, 3H), 7.32 (d, *J* = 14.8 Hz, 1H, H-10), 6.90 – 6.70 (m, 3H), 5.83 (ddd, *J* = 17.2, 10.4, 5.2 Hz, 1H, H-21), 5.25 – 5.03 (m, 2H, H-22), 4.62 (dt, *J* = 5.2, 1.6 Hz, 2H, H-20), 3.02 (s, 6H, H-18,19).

### Σύνθεση της ένωσης 21

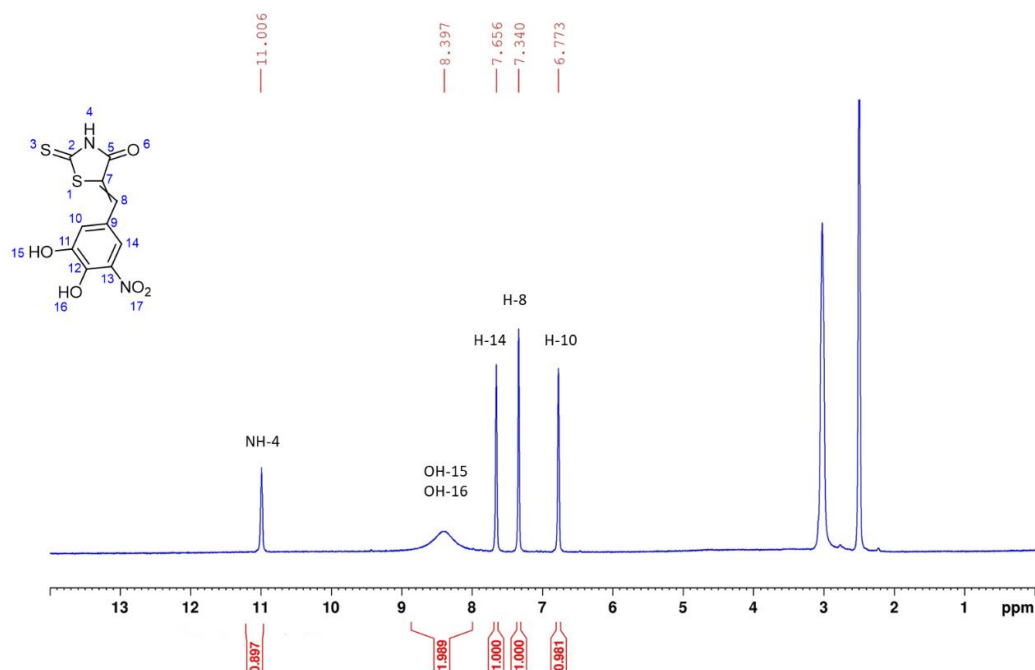


**Εικόνα 149.** Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας της ένωσης 21.

### Πειραματική πορεία

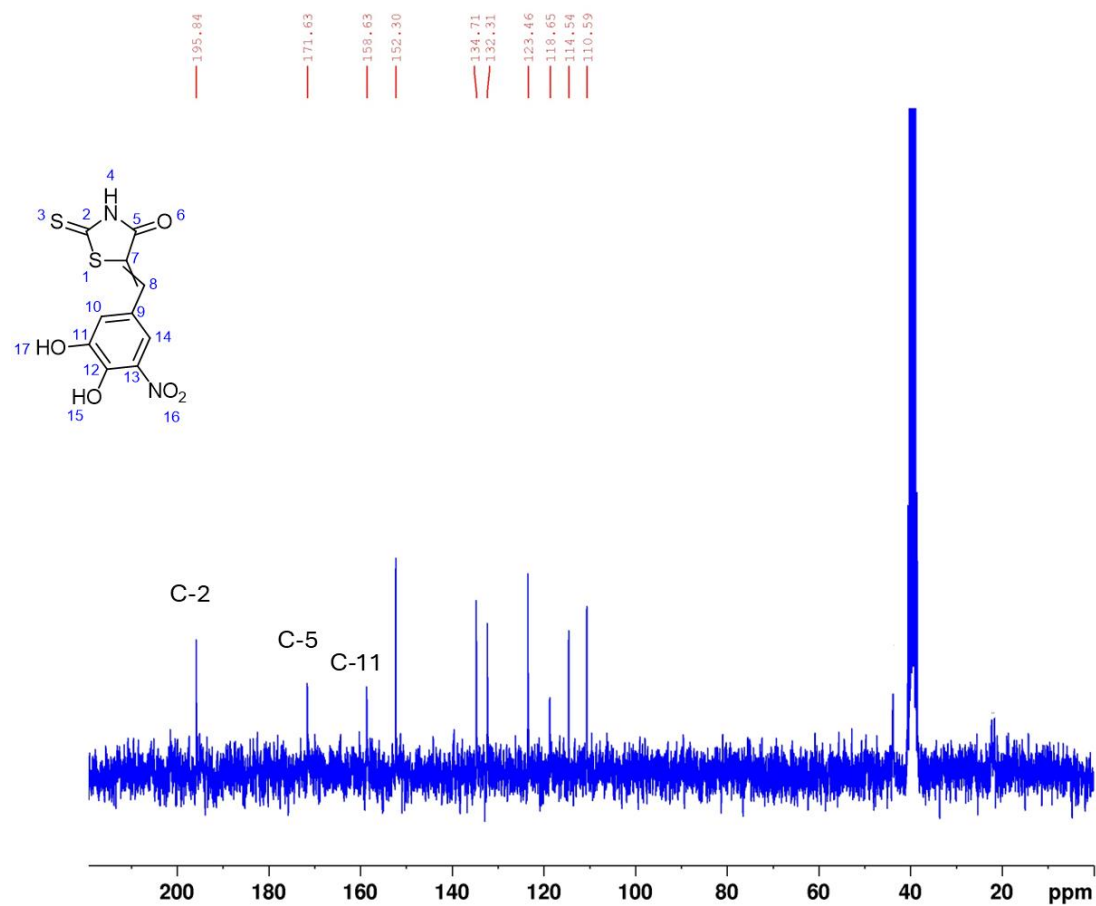
Σε σφαιρική φιάλη των 25 ml τοποθετήθηκε η 2-θειοξοθειαζολιδιν-4-όνη (100 mg, 0,7508 mmol) και η 3,4-διϋδροξυ-5-νιτροβενζαλδεΐδη (137,5 mg, 0,7508 mmol). Ακολούθησε η προσθήκη ακετονιτριλίου (5 ml) ως διαλύτη, καθώς επίσης και της πιπεριδίνης (7,4 mL, 0,0751 mmol) ως βάση. Το αντιδρών μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση με θέρμανση υπό αναρροή ( $82^\circ\text{C}$ ) για 7 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών ανάπτυξης 5% v/v μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ακολούθησε εξάτμιση του διαλύτη και της βάσης υπό υψηλό κενό και η απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (Silica gel) σε σύστημα διαλυτών έκλουσης μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο. (Απόδοση 83%).

### Ταυτοποίηση της ένωσης 21



**Εικόνα 150.** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 21 σε διαλύτη  $\text{DMSO-}d^6$  (250 MHz, 25 °C).

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO):  $\delta$  11.01 (s, 1H, NH-4), 8.40 (s, 2H, OH-15 και OH-16), 7.66 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H, H-14), 7.34 (s, 1H, H-8), 6.78 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 1H, H-10).

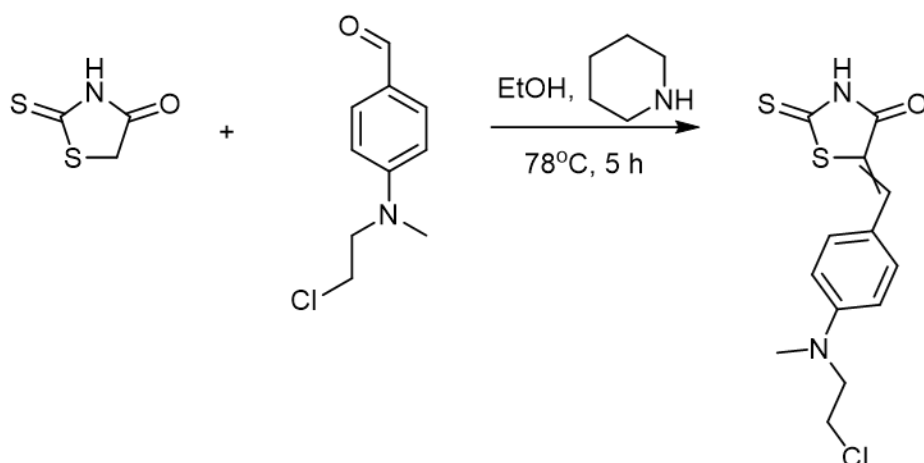


**Εικόνα 151.** Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 21 σε διαλύτη  $\text{DMSO-}d^6$  (63 MHz, 25 °C).

$^{13}\text{C}$  NMR (63 MHz, DMSO):  $\delta$  195.84 (C-2), 171.62 (C-5), 158.63 (C-11), 152.30, 134.71, 132.31, 123.46, 118.65, 114.55, 110.59.



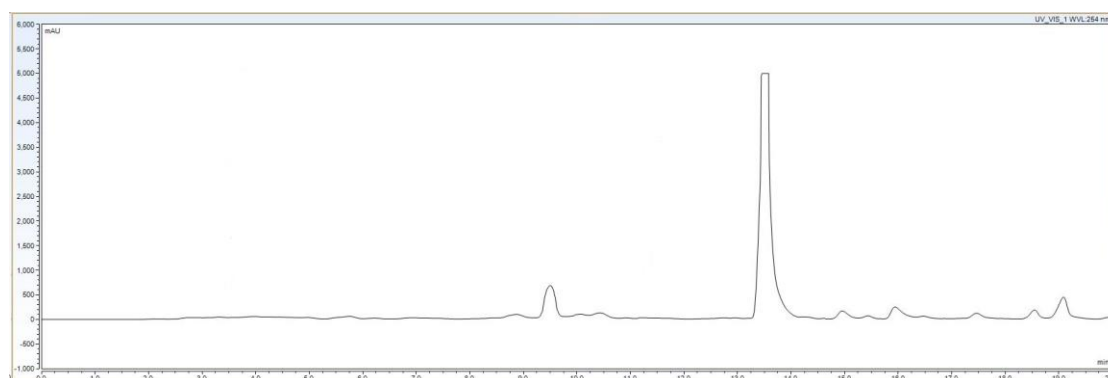
### Σύνθεση της ένωσης 22



**Εικόνα 152.** Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας της ένωσης 22.

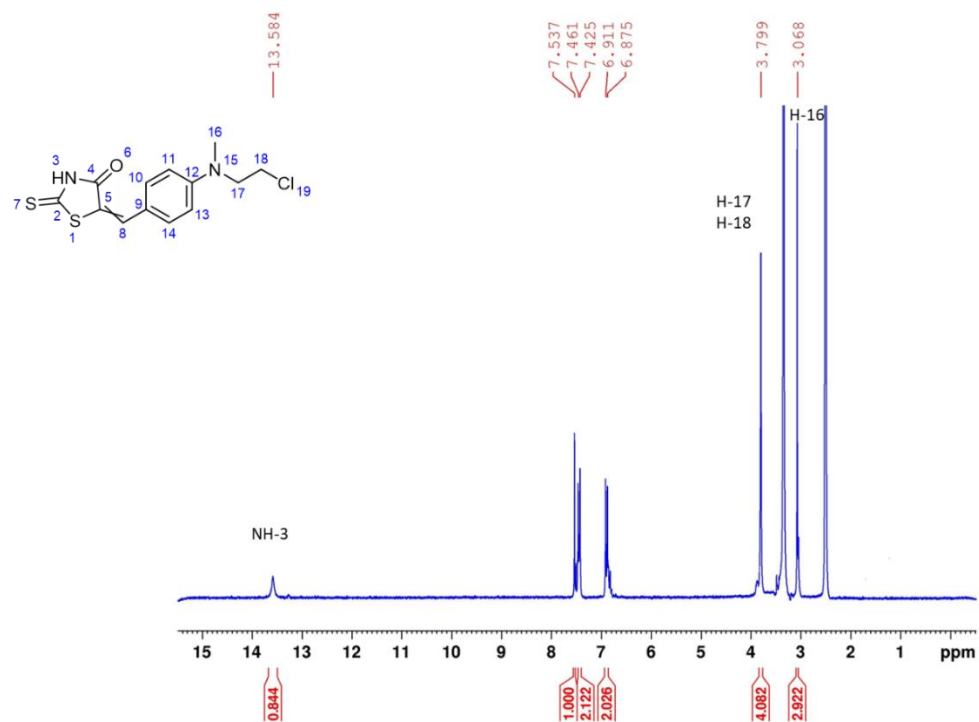
### Πειραματική πορεία

Σε σφαιρική φιάλη των 25 ml τοποθετήθηκε η 2-θειοξοθειαζολιδιν-4-όνη (100 mg, 0,7508 mmol) και η 4-((2-χλωροαιθυλ)(μεθυλ)αμινο)βενζαλδεΐδη (148,4 mg, 0,7508 mmol). Ακολούθησε η προσθήκη αιθανόλης (3,5 ml) ως διαλύτη, καθώς επίσης και της πιπεριδίνης (7,4 μL, 0,0751 mmol) ως βάση. Το αντιδρών μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση με θέρμανση υπό αναρροή (78 °C) για 5 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών ανάπτυξης 4% v/v μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ακολούθησε εξάτμιση του διαλύτη και της βάσης υπό υψηλό κενό και η απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC σε σύστημα διαλυτών ακετονιτρίλιο/νερό (40% ακετονιτρίλιο-60% νερό για t=0 min έως 100% ακετονιτρίλιο για t=20 min, με ροή διαλύτη 20 ml/min, ανιχνευτής στα 254 nm). Η έκλυση και συλλογή του επιθυμητού προϊόντος πραγματοποιήθηκε στα 13,5 min. Το διάλυμα λυοφιλοποιήθηκε προς απομάκρυνση του νερού και έτσι έγινε παραλαβή κόκκινου στερεού σε απόδοση 88% (208 mg).

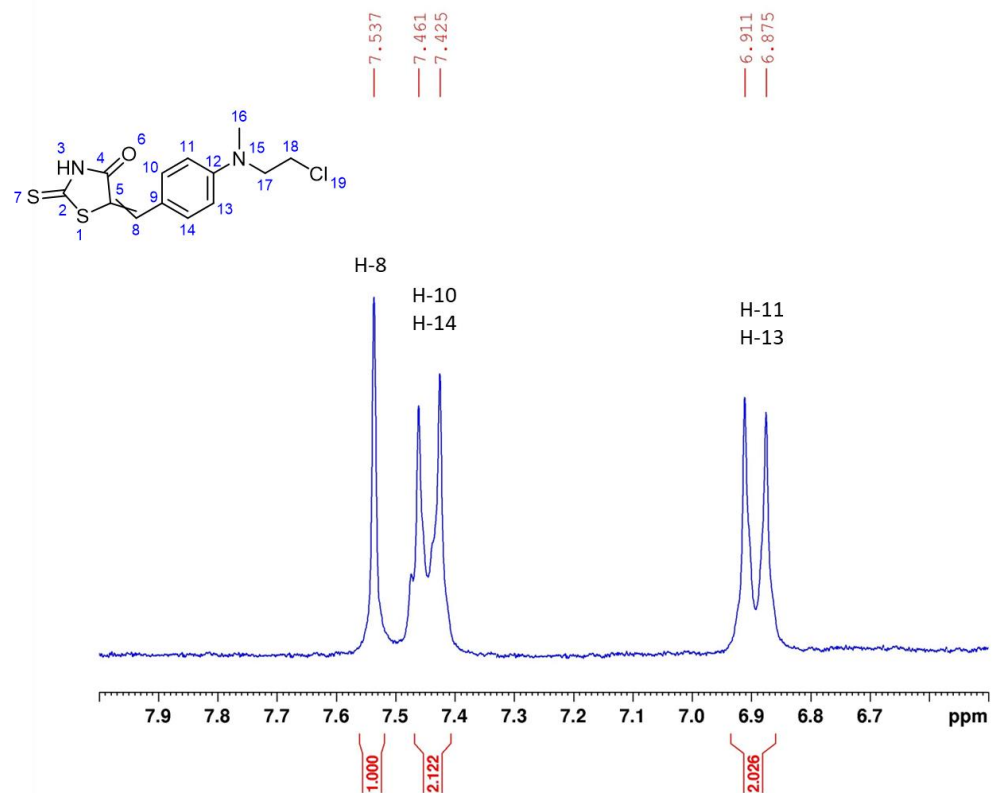


**Εικόνα 153.** Χρωματογράφημα της ένωσης 22. Διαφάνεται η κορυφή στα 13,5 min, η οποία αντιστοιχεί στο επιθυμητό προϊόν.

Ταυτοποίηση της ένωσης 22

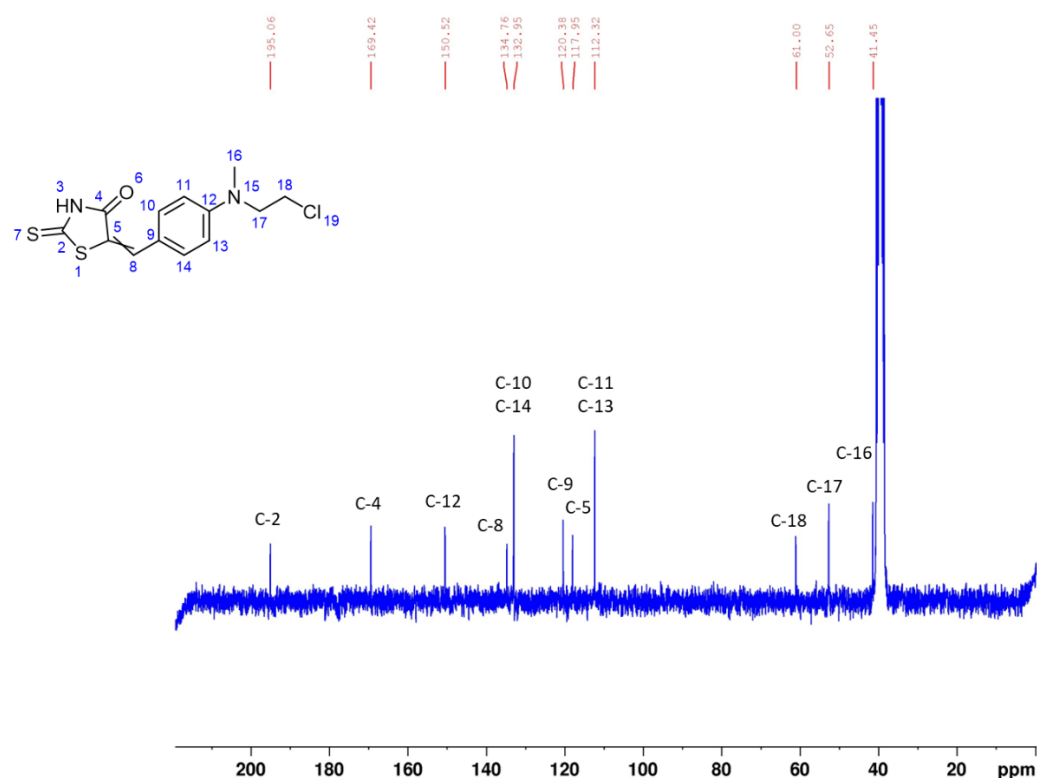


Εικόνα 154. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 22 σε διαλύτη  $\text{DMSO}-d^6$  (250 MHz, 25 °C).



**Εικόνα 155.** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 22, με έμφαση στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων, σε διαλύτη DMSO (250 MHz, 25 °C).

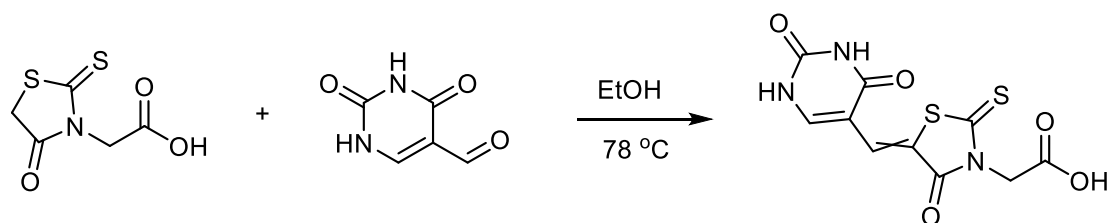
**$^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO):**  $\delta$  13.58 (s, 1H, NH-3), 7.54 (s, 1H, H-8), 7.44 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H, H-10 και H-14), 6.89 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H, H-11 και H-13), 3.80 (s, 4H, H-17 και H-18), 3.07 (s, 3H, H-16).



**Εικόνα 156.** Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 22 σε διαλύτη DMSO- $d^6$  (63 MHz, 25°C).

**$^{13}\text{C}$  NMR (63 MHz, DMSO):**  $\delta$  195.07 (C-2), 169.42 (C-4), 150.53 (C-12), 134.77 (C-8), 132.95 (C-10 και C-14), 120.38 (C-9), 117.95 (C-5), 112.33 (C-11 και C-13), 61.00 (C-18), 52.65 (C-17), 41.46 (C-16).

Σύνθεση της ένωσης 23

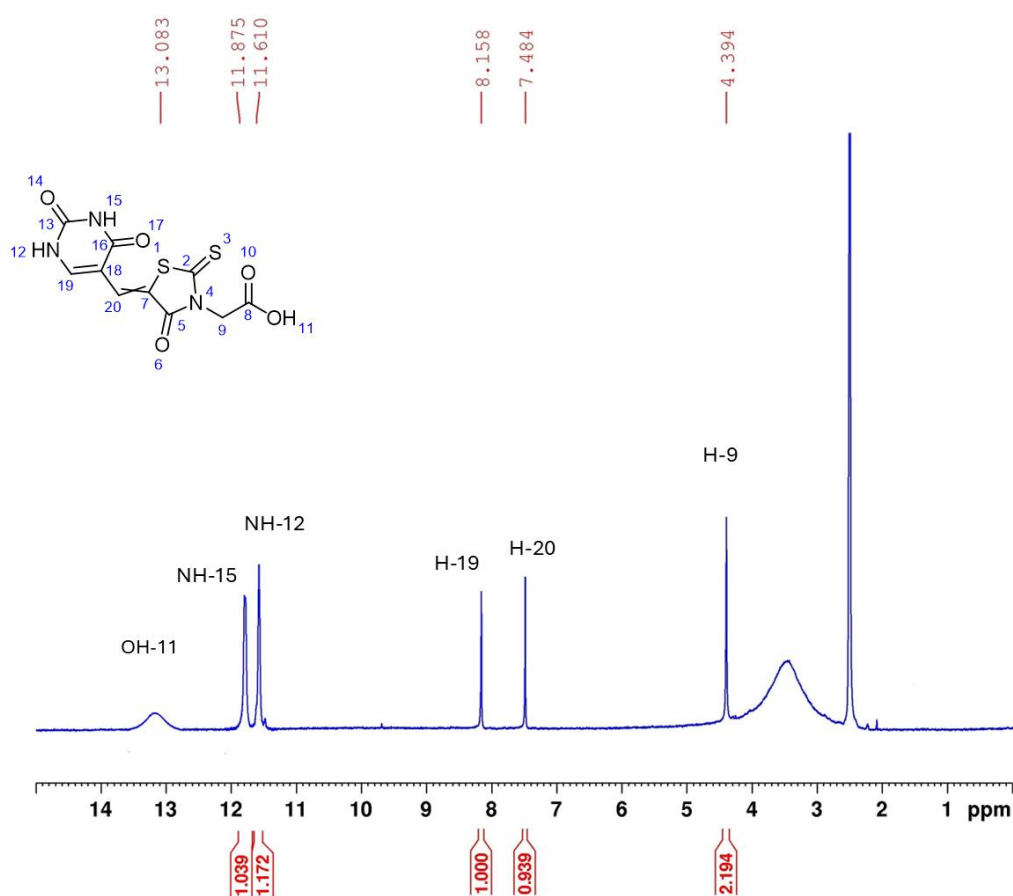


**Εικόνα 157.** Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας της ένωσης 23.

### Πειραματική πορεία

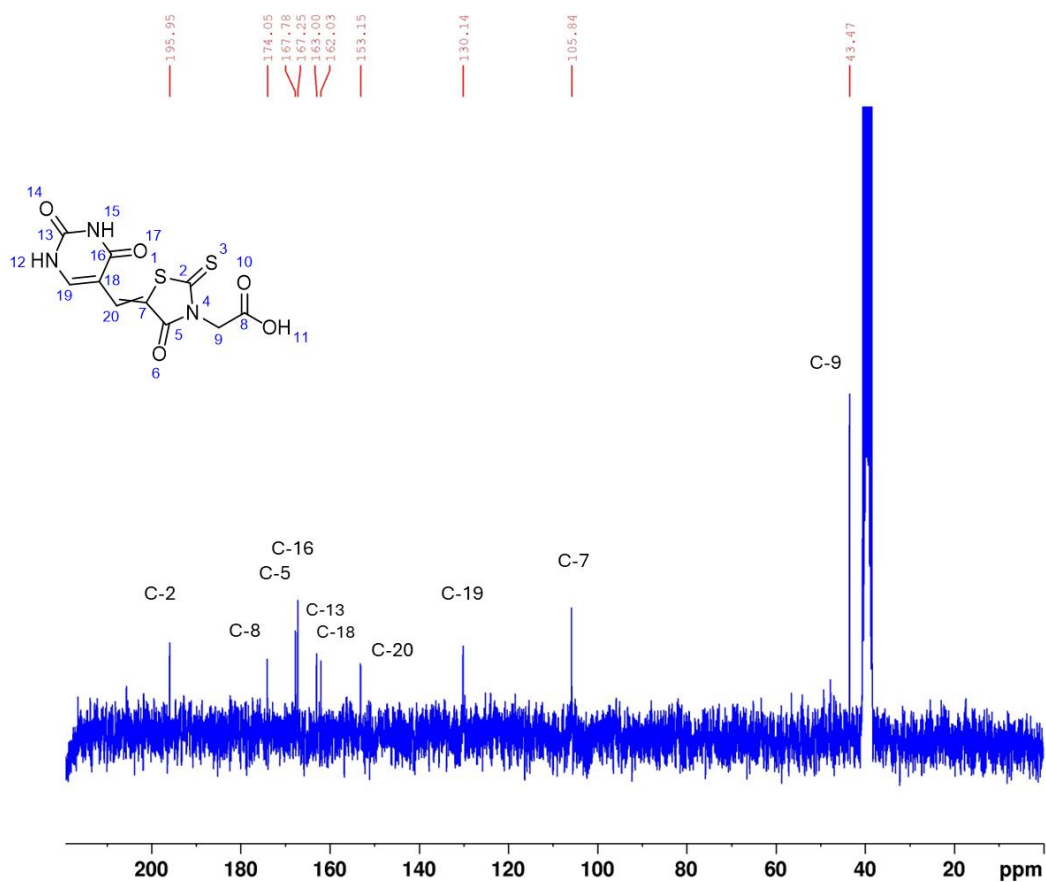
Σε σφαιρική φιάλη των 25 ml τοποθετήθηκε το 2-(4-οξο-2-θειοξοθειαζολιδιν-3-υλ)οξικό οξύ (100 mg, 0,5230 mmol) και η ουρακίλη-5-καρβοξαλδεΐδη (73,3 mg, 0,5230 mmol). Ακολούθησε η προσθήκη αιθανόλης (3,0 ml) ως διαλύτη. Το αντιδρών μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση με θέρμανση υπό αναρροή (78 °C) για 4 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών ανάπτυξης 5% v/v μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο. Παρατηρήθηκε καταβύθιση κίτρινου στερεού, το οποίο φυγοκεντρήθηκε και απομονώθηκε. Το στερεό ταυτοποιήθηκε ως το επιθυμητό προϊόν με φασματοσκοπία NMR, με απόδοση σύνθεσης 82% (134,4 mg).

### Ταυτοποίηση της ένωσης 23



**Εικόνα 158.** Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της ένωσης 23 σε διαλύτη DMSO-d<sup>6</sup> (250 MHz, 25 °C).

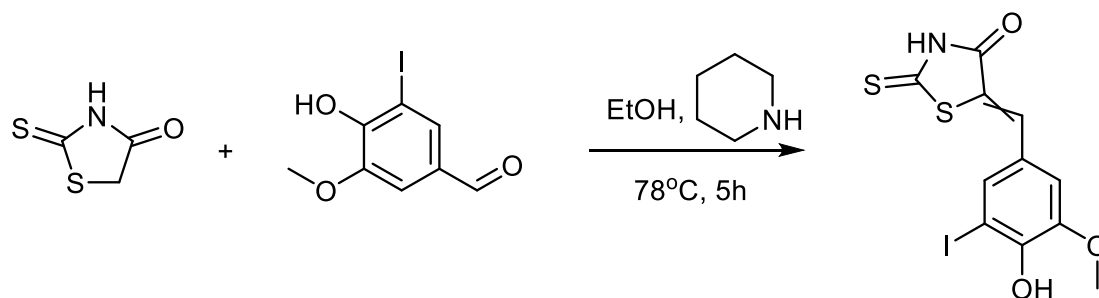
**<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, DMSO):** δ 13.08 (s, 1H, OH-11), 11.87 (s, 1H, NH-15), 11.61 (s, 1H, NH-12), 8.16 (s, 1H, H-19), 7.48 (s, 1H, H-20), 4.39 (s, 2H, H-9).



**Εικόνα 159.** Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 23 σε διαλύτη  $\text{DMSO}-d^6$  (63 MHz,  $25^\circ\text{C}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (63 MHz, DMSO):  $\delta$  195.95 (C-2), 174.05 (C-8), 167.78 (C-5), 167.25 (C-16), 163.00 (C-13), 162.03 (C-18), 153.15 (C-20), 130.14 (C-19), 105.84 (C-7), 43.47 (C-9).

Σύνθεση της ένωσης 24

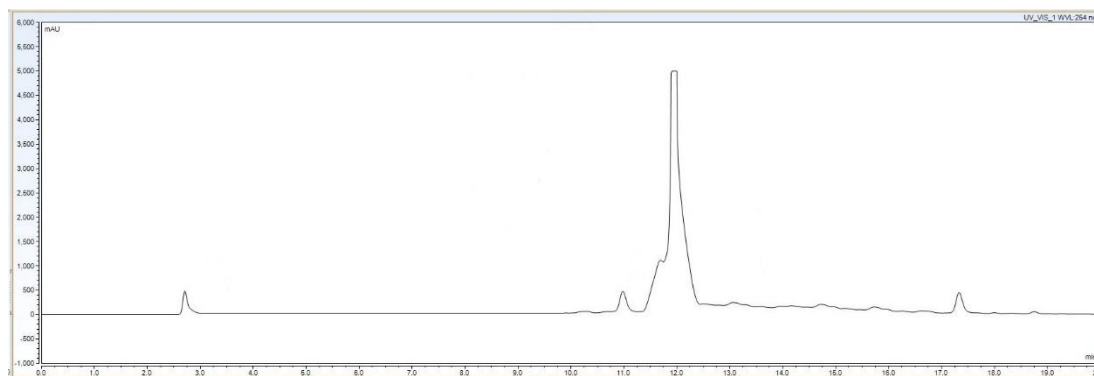


**Εικόνα 160.** Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας της ένωσης 24.

Πειραματική πορεία

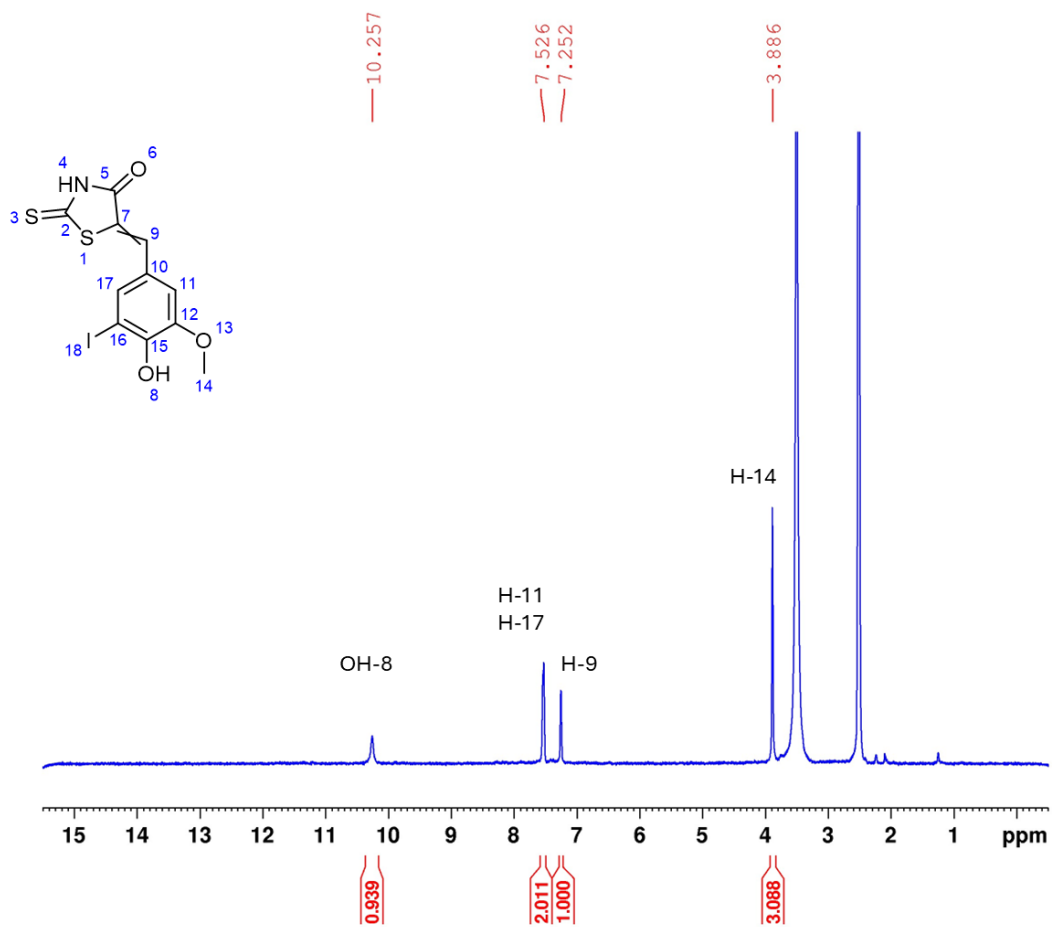
Σε σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε η 2-θειοθειαζολιδιν-4-όνη (100 mg, 0,7508 mmol) και η 4-υδροξυ-3-ιοδο-5-μεθοξυβενζαλδεΐδη (208,8 mg, 0,7508 mmol). Ακολούθησε η προσθήκη αιθανόλης (3,0 ml) ως διαλύτη, καθώς επίσης και της πιπεριδίνης (7,4  $\mu\text{L}$ , 0,0751 mmol) ως

βάση. Το αντιδρών μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση με θέρμανση υπό αναρροή (78 °C) για 5 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών ανάπτυξης 5% v/v μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ακολούθησε εξάτμιση του διαλύτη και της βάσης υπό υψηλό κενό και η απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC σε σύστημα διαλυτών ακετονιτρίλιο/νερό (40% ακετονιτρίλιο-60% νερό για t=0 min έως 100% ακετονιτρίλιο για t=20 min, με ροή διαλύτη 20 ml/min, ανιχνευτής στα 254 nm). Η έκλυση και συλλογή του επιθυμητού προϊόντος πραγματοποιήθηκε στα 11,5 min. Το διάλυμα λυοφιλοποιήθηκε προς απομάκρυνση του νερού και έτσι έγινε παραλαβή κ στερεού σε απόδοση 81% (239 mg).



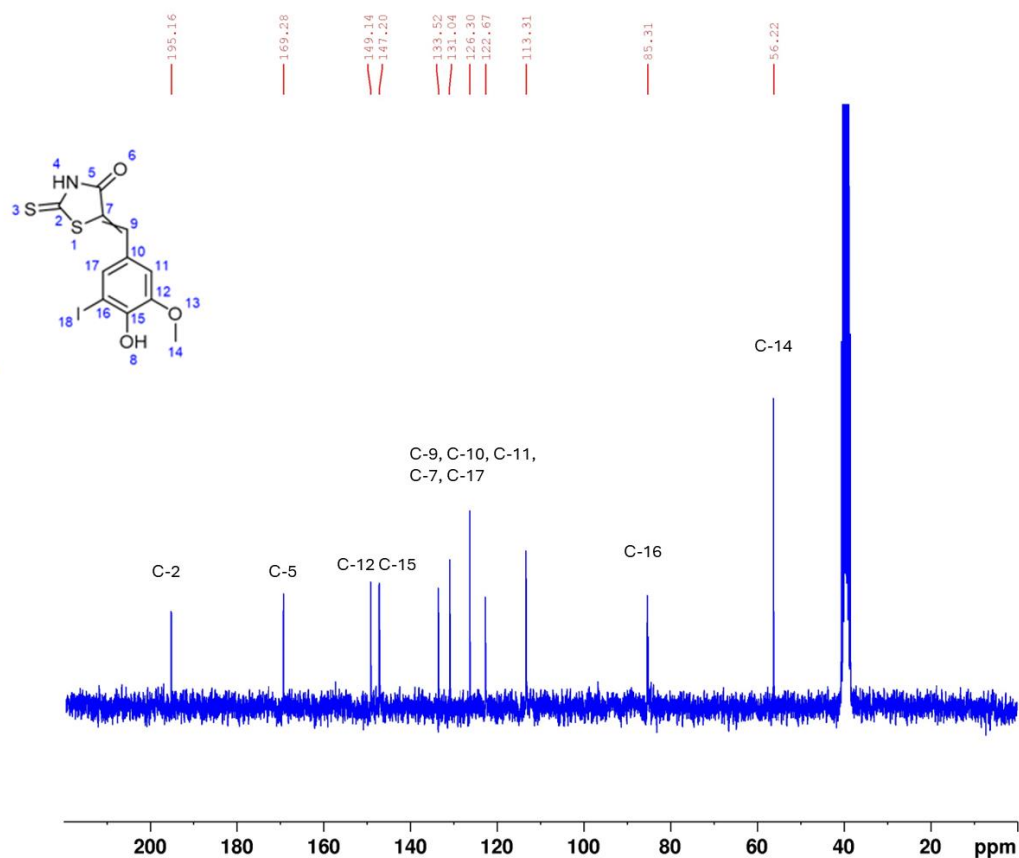
**Εικόνα 161.** Χρωματογράφημα της ένωσης 24. Διαφαίνεται η κορυφή στα 11,5 min, η οποία αντιστοιχεί στο επιθυμητό προϊόν.

#### Ταυτοποίηση της ένωσης 24



**Εικόνα 162.** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 24 σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  (250 MHz, 25 °C).

$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{DMSO}$ ):  $\delta$  10.26 (s, 1H, OH-8), 7.53 (s, 2H, H-11 και H-17), 7.25 (s, 1H, H-9), 3.89 (s, 3H, H-14).



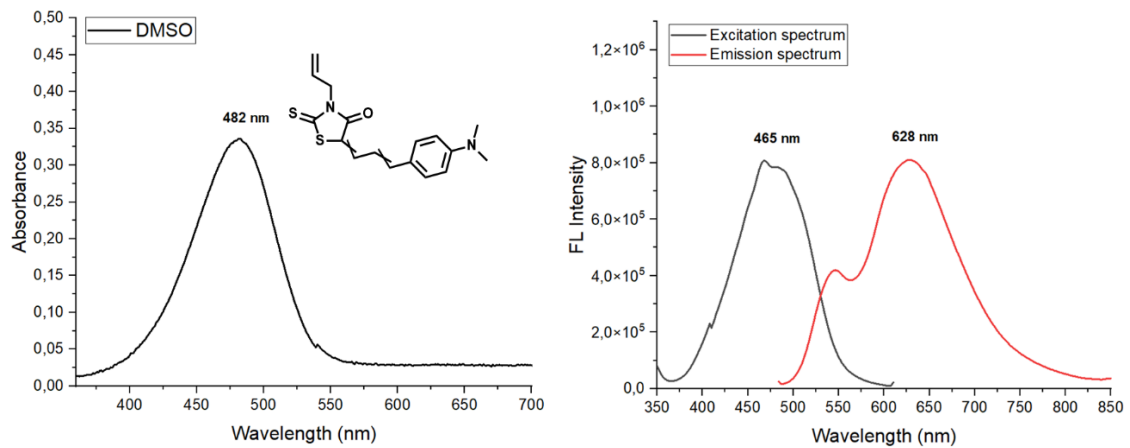
**Εικόνα 163.** Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 24 σε διαλύτη  $\text{DMSO-}d^6$  (63 MHz,  $25^\circ\text{C}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (63 MHz, DMSO): 195.16 (C-2), 169.28 (C-5), 149.14 (C-12), 147.20 (C-15), 133.52, 131.04, 126.30, 122.67, 113.31, 85.31 (C-16), 56.22 (C-14).

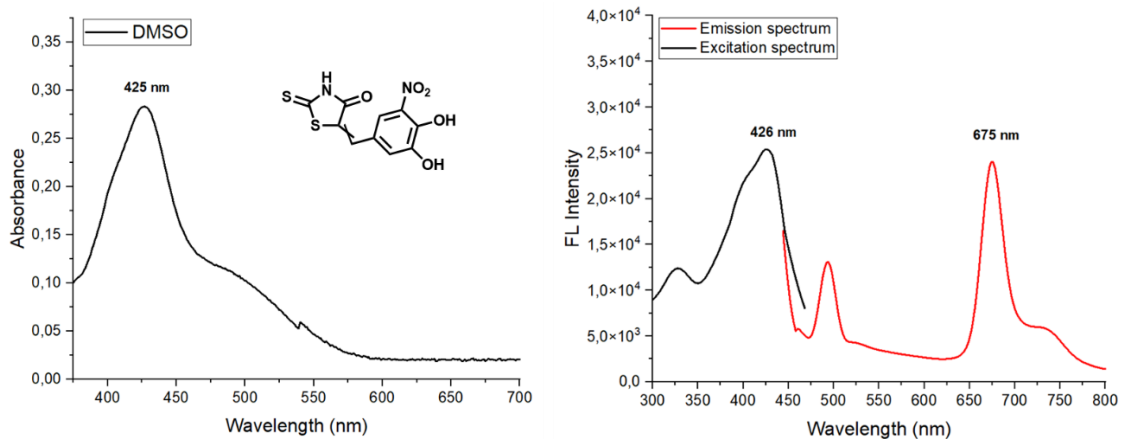
### 5.2.3 Μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων των πιθανών αναστολέων της Nsp15

Προτού αξιολογήσουμε την ανασταλτική ισχύ των συντιθέμενων αναλόγων της ροδανίνης έναντι της Nsp15, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τις φωτοφυσικές ιδιότητες των ενώσεων αυτών. Η ροδανίνη δύναται να αποτελέσει φθοροφόρο πυρήνα, καθώς διαθέτει ομάδες-δέκτες ηλεκτρονικακής πυκνότητας. Επιπλέον, υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές για ενώσεις, οι οποίες αλλάζουν τον φθορισμό τους όταν δεσμευτούν στην πρωτεΐνη ή τον υποδοχέα-στόχο, αποτελώντας έτσι, χρήσιμα εργαλεία μελέτης της πρόσδεσης του αναστολέα. [170][171] Για να εξακριβώσουμε εάν ισχύει κάτι τέτοιο στην περίπτωση μας, αρχικά πραγματοποιήσαμε πειράματα φασματοσκοπίας, ορατού-υπεριώδους και φθορισμού, για τα 6 ανάλογα της ροδανίνης, σε σύστημα διαλυτών 70%/30% v/v  $\text{DMSO-PBS}$  (pH 7.4). Για τις ενώσεις **19** και **23** δεν παρατηρήθηκε κάποιο αξιολογικό χαρακτηριστικό σχετικά με τον φθορισμό τους. Για τις υπόλοιπες ενώσεις, καταγράφηκαν φάσματα απορρόφησης με τις μέγιστες τιμές απορρόφησης να κυμαίνονται από 423 έως 482 nm. Αντίστοιχα, καταγράφηκαν φάσματα διέγερσης και εκπομπής, με μήκη κύματος φθορισμού από 500 έως 675 nm. Από τις τιμές μετατόπισης Stokes μπορούμε να υποθέσουμε ότι όλες οι ενώσεις φθορίζουν λόγω του φαινομένου ενδομοριακής μεταφοράς φορτίου, ICT.

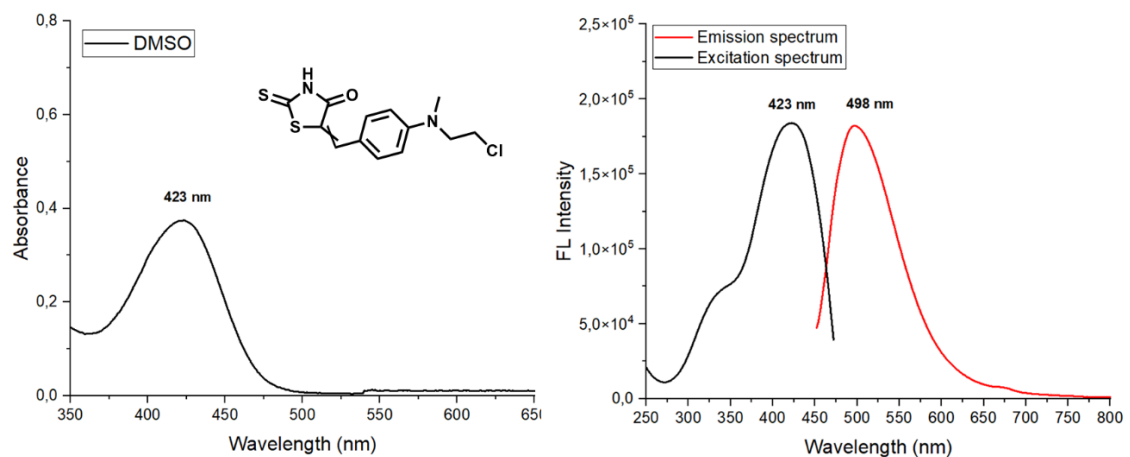




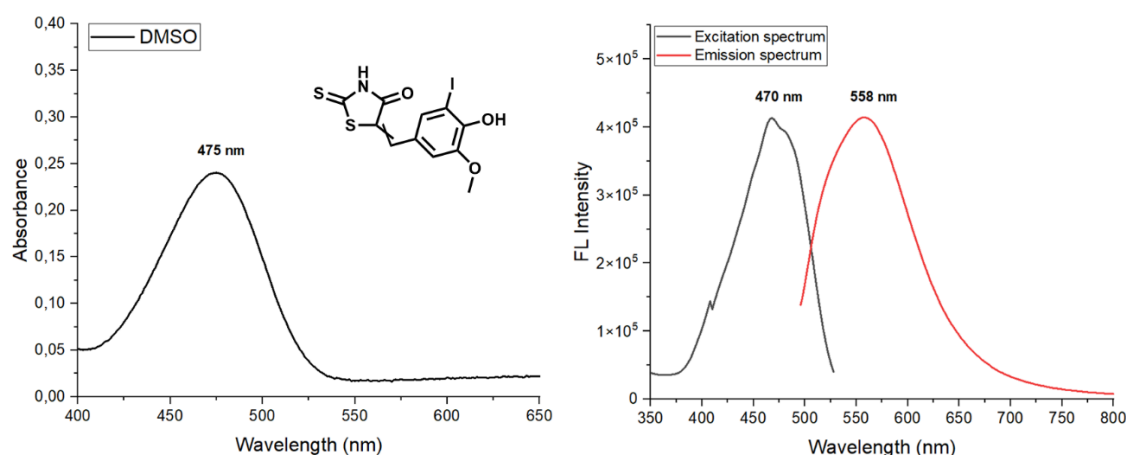
**Εικόνα 164.** Φάσμα απορρόφησης, διέγερσης και φθορισμού της ένωσης **20** (συγκέντρωσης 10  $\mu$ M) σε σύστημα διαλυτών 70%/30% v/v DMSO-PBS buffer, σε θερμοκρασία 37 °C και step 2, ExBw: 10, EmBw: 10.



**Εικόνα 165.** Φάσμα απορρόφησης, διέγερσης και φθορισμού της ένωσης **21** (συγκέντρωσης 10  $\mu$ M) σε σύστημα διαλυτών 70%/30% v/v DMSO-PBS buffer, σε θερμοκρασία 37 °C και step 2, ExBw: 10, EmBw: 10.



**Εικόνα 166.** Φάσμα απορρόφησης, διέγερσης και φθορισμού της ένωσης **22** (συγκέντρωσης 10  $\mu$ M) σε σύστημα διαλυτών 70%/30% v/v DMSO-PBS buffer, σε θερμοκρασία 37 °C και step 2, ExBw: 10, EmBw: 10.



**Εικόνα 167.** Φάσμα απορρόφησης, διέγερσης και φθορισμού της ένωσης **24** (συγκέντρωσης 10  $\mu$ M) σε σύστημα διαλυτών 70%/30% v/v DMSO-PBS buffer, σε θερμοκρασία 37 °C και step 2, ExBw: 10, EmBw: 10.

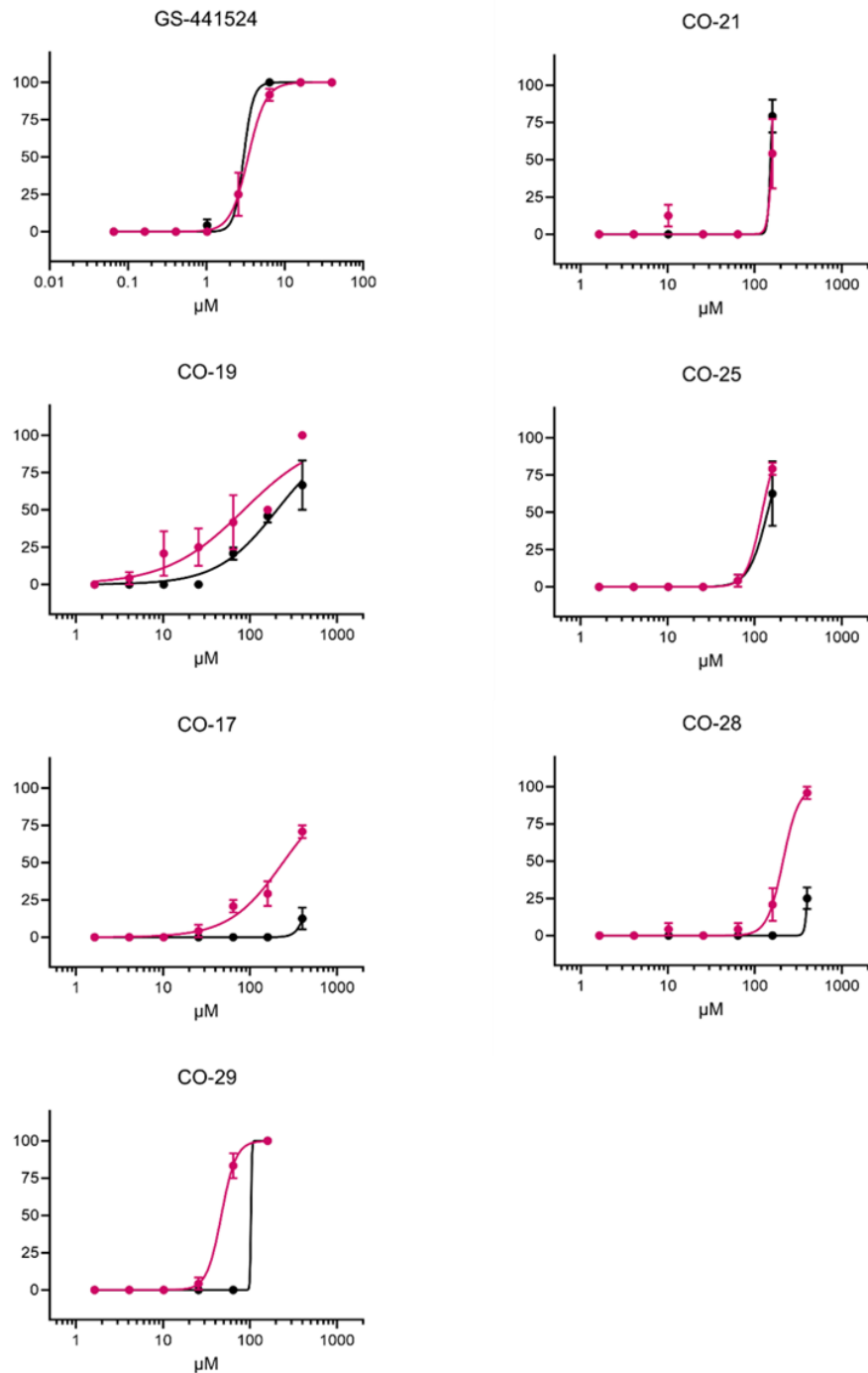
Ένωση	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{exc}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	Stokes shift
Ένωση 20	482	465	628	163
Ένωση 21	425	426	675	249
Ένωση 22	423	423	498	75
Ένωση 24	475	470	558	88

**Πίνακας 6.** Συγκεντρωτικός πίνακας των μηκών κύματος απορρόφησης, διέγερσης και εκπομπής, καθώς επίσης και των τιμών μετατόπισης Stokes, για τα 4 ανάλογα της ροδανίνης.

#### 5.2.4 Βιολογική αξιολόγηση των αναλόγων της ροδανίνης ως προς την ικανότητά τους να δρουν εναντίον του ιού SARS-CoV-2, αναστέλλοντας την πρωτεΐνη Nsp15

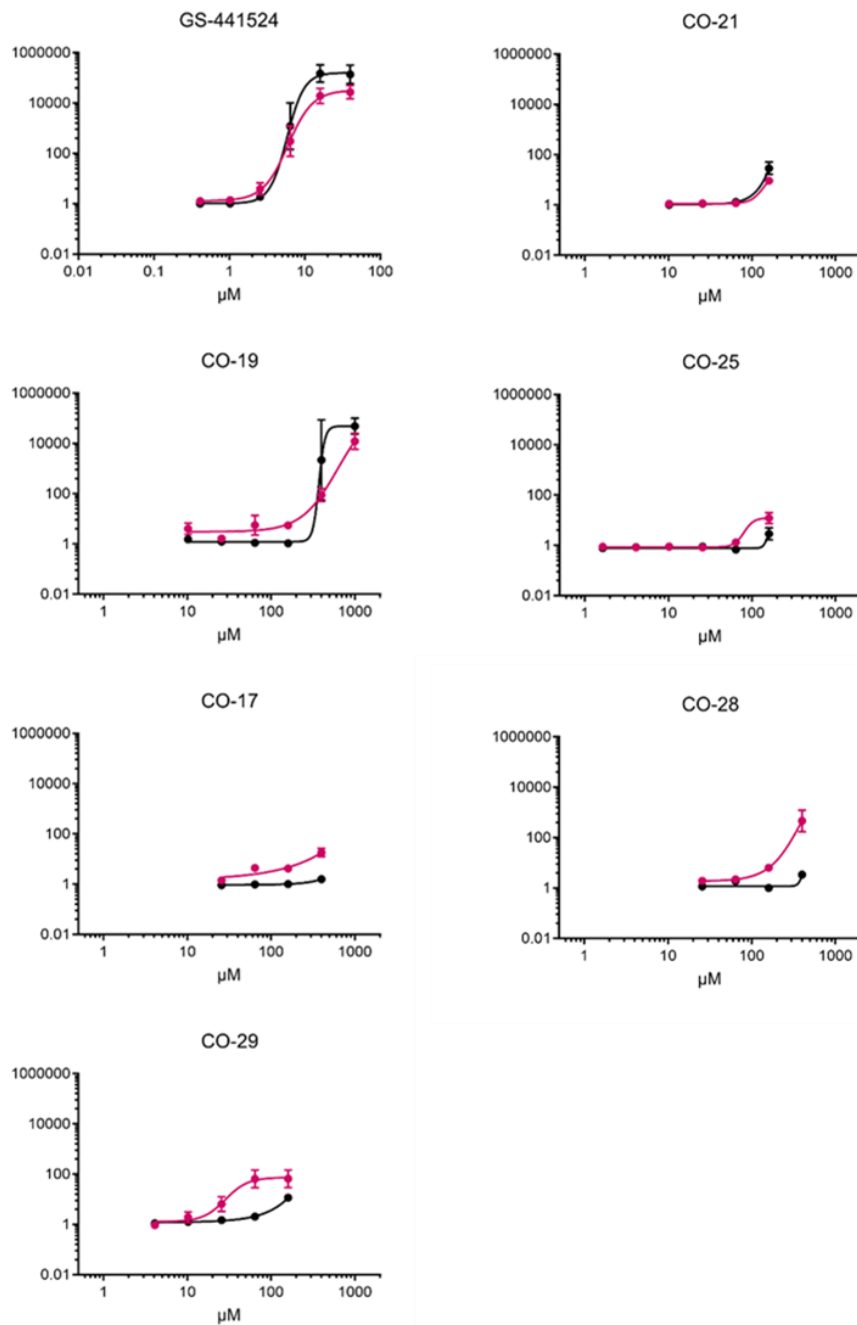
Προκειμένου να αξιολογηθεί η ικανότητα των αναλόγων της ροδανίνης, που συντέθηκαν, να λειτουργούν εναντίον του SARS-CoV-2 αναστέλλοντας τη δράση της Nsp15, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με τον τρόπο που περιγράφηκε και στην **Ενότητα 5.1.5.4**. Αρχικά, έγιναν πειράματα σε ινοβλαστικά κύτταρα ανθρώπινου εμβρυϊκού πνεύμονα, που μολύνθηκαν με τον ιό H-CoV-229-E, ο οποίος συνιστά έναν κορωνοϊό που μολύνει τους ανθρώπους, αποτελεί την βασική αιτία του κοινού κρυολογήματος, και εμφανίζει αρκετά υψηλή αναλογία με τον SARS-CoV-2. Τα πειράματα έγιναν σε κύτταρα, που έχουν ενεργή την Nsp15 (Wild type virus, WT), καθώς επίσης και σε κύτταρα τα οποία διαθέτουν μεταλλαγμένη την πρωτεΐνη στο αμινοξύ His250 (H250A). Ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το νουκλεοσιδικό ανάλογο της Ρεμτεσιβίρης, GS-441524. Κατά αυτόν τον τρόπο, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της εκάστοτε ένωσης που απαιτείται ώστε να επιτευχθεί 50% αναστολή της επίδρασης του ιού στα κύτταρα, **EC50** (όπως προσδιορίστηκε με visual scoring του CPE (cytopathic effect), ή με μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη χρωματομετρική ανάλυση MTS) (**Εικόνα 169**). Επιπλέον, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της εκάστοτε ένωσης που απαιτείται ώστε να επιτευχθεί μείωση του ιικού φορτίου κατά 10 φορές (**EC90**), καθώς επίσης έλαβαν χώρα και πειράματα κυτταροτοξικότητας.

% Inhibition of HCoV-229E WT (●)  
or Nsp15-mutant (●)



**Εικόνα 169.** Διάγραμμα της % αναστολής του ιού HCoV-229E συναρτήσει της συγκέντρωσης του εκάστοτε πιθανού αναστολέα. Οι μαύρες κουκίδες αντιπροσωπεύουν τον ιό που διαθέτει ενεργή την Nsp15, ενώ οι ροζ κουκίδες τον ιό που φέρει τη μεταλλαγμένη της μορφή. Η τιμή EC50 για την ένωση αναφοράς κυμαίνεται κοντά στα 3.0  $\mu\text{M}$ , τόσο για τον WT (Wild type) όσο και για τον mutant ιό. Για τα περισσότερα ανάλογα της ροδανίνης επιτεύχθηκε αναστολή, αλλά οι απαιτούμενες συγκεντρώσεις ξεπερνούν τα **100  $\mu\text{M}$** . Καλύτερη δράση φαίνεται να έχουν οι ενώσεις CO-25 και CO-29 με τιμές EC50 **122  $\mu\text{M}$**  και **64  $\mu\text{M}$**  αντίστοιχα. Παρόμοιες τιμές EC50 καταγράφηκαν τόσο για τον WT όσο και για τον mutant ιό.

Fold reduction of HCoV-229E WT (●) or Nsp15-mutant (●)



**Εικόνα 170.** Διάγραμμα του αριθμού μείωσης του ιικού φορτίου του ιού HCoV-229E συναρτήσει της συγκέντρωσης του εκάστοτε πιθανού αναστολέα. Οι μαύρες κουκίδες αντιπροσωπεύουν τον ιό που διαθέτει ενεργή την Nsp15, ενώ οι ροζ κουκίδες τον ιό που φέρει τη μεταλλαγμένη της μορφή. Η τιμή EC<sub>90</sub> για την ένωση αναφοράς κυμαίνεται κοντά στα 4.0 μM, τόσο για τον WT (Wild type) όσο και για τον mutant ιό. Για όλα τα ανάλογα της ροδανίνης οι τιμές EC<sub>90</sub> ξεπερνούν τα 100 μM, με τα ανάλογα που εμφάνισαν την καλύτερη δράση να είναι τα CO-21 (EC<sub>90</sub>: 139 μM), CO-29 (EC<sub>90</sub>: 153 μM) και CO-19, το οποίο κατάφερε μείωση του ιικού φορτίου κατά 10000 αλλά σε συγκέντρωση κοντά στα 300 μM.

Αξίζει να αναφερθεί πως για όλα τα ανάλογα πραγματοποιήθηκαν πειράματα κυτταροτοξικότητας, σύμφωνα με τα οποία όλες οι ενώσεις εμφάνισαν μερική

κυτταροτοξικότητα για συγκεντρώσεις άνω των 400  $\mu\text{M}$ , τιμή αρκετά υψηλότερη σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις που απαιτούνται για την ανασταλτική δράση έναντι του ιού.

---

## Συμπεράσματα-Συζήτηση Αποτελεσμάτων

---

Όπως έγινε κατανοητό τόσο από το εισαγωγικό μέρος, όσο και από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο της εν λόγω μεταπτυχιακής διατριβής, η Nsp15 αποτελεί έναν από τους βασικούς θεραπευτικούς στόχους για την καταπολέμηση του ιού SARS-CoV-2. Έτσι, λοιπόν σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε ορθολογικός σχεδιασμός, πειράματα *in silico* και πράσινη σύνθεση υψηλών αποδόσεων, 5 ενώσεων, βασιζόμενων στο μόριο της Ισατίνης, των οποίων χαρακτηριστικό γνώρισμα είναι η αντικατάσταση της καρβονυλοομάδας από δύο νιτριλο-ομάδες. Από βιολογικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, επιβεβαιώθηκε πως όλα τα ανάλογα εμφάνισαν ανασταλτική δράση έναντι της Nsp15, με το ανάλογο που φέρει δύο βρώμια ως υποκαταστάτες να διαθέτει τιμή  $IC_{50}$  της τάξης των **40-50  $\mu\text{M}$**  και ταυτόχρονα να επιτυγχάνει μείωση του ιικού φορτίου του ιού κατά **68.000 φορές** σε συγκέντρωση **80  $\mu\text{M}$** , χωρίς να φέρει κάποια κυτταροτοξικότητα σε αυτές τις συγκεντρώσεις. Έπειτα, από αυτά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα αποφασίσαμε να αξιοποιήσουμε άλλη μία ετεροκυκλική ένωση, η οποία συναντάται σε αρκετά φαρμακευτικά ανάλογα, τη ροδανίνη, ώστε να αναπτύξουμε μια δεύτερη γενιά πιθανών αναστολέων της Nsp15. Έτσι, συντέθηκαν 6 ανάλογα της ροδανίνης, μέσω συμπύκνωσης με διάφορες αλδεΐδες και οι ενώσεις αυτές ελέγχθηκαν ως προς την ανασταλτική τους δράση έναντι της Nsp15, αλλά και ως προς τη δράση τους έναντι του ιού HCoV-229E, ιός αρκετά ομόλογος με τον SARS-CoV-2. Τα βιολογικά πειράματα έδειξαν δράση έναντι του ιού HCoV-229E, αλλά σε συγκεντρώσεις αναστολέα άνω των 100  $\mu\text{M}$ . Επιπλέον, σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν τόσο σε κύτταρα του ιού που φέρουν ενεργή την Nsp15, όσο και σε κύτταρα στα οποία είναι μεταλλαγμένη, παρατηρήθηκε πως οι αναστολείς εμφάνισαν παρόμοια συμπεριφορά, γεγονός που γεννά ερωτήματα σχετικά με το εάν η μείωση του ιικού φορτίου οφείλεται σε ταυτόχρονη αναστολή της Nsp15, ή σε αναστολή κάποιου άλλου παράγοντα. Βέβαια πρέπει να διευκρινισθεί πως τα δεδομένα σχετικά με τα ανάλογα της ροδανίνης είναι ακόμα σε αρχικό στάδιο και τα πειράματα θα επαναληφθούν.

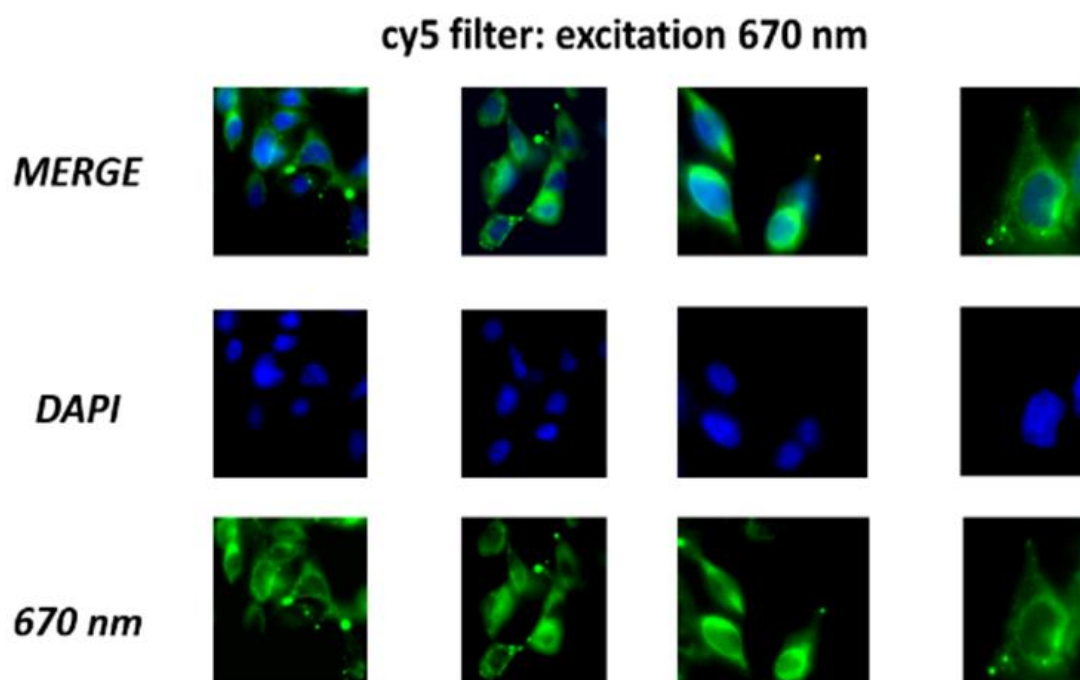
---

## Παράρτημα

---

Σε αυτό το σημείο παρουσιάζονται κάποια πρωταρχικά, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, αποτελέσματα σχετικά με τη δράση της ένωσης TA-38B.

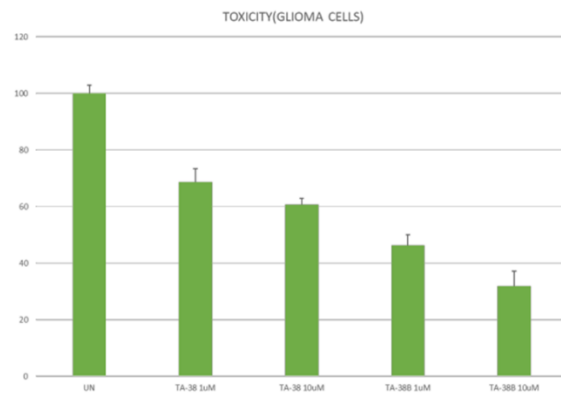
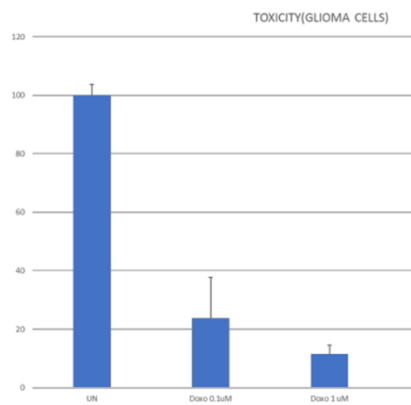
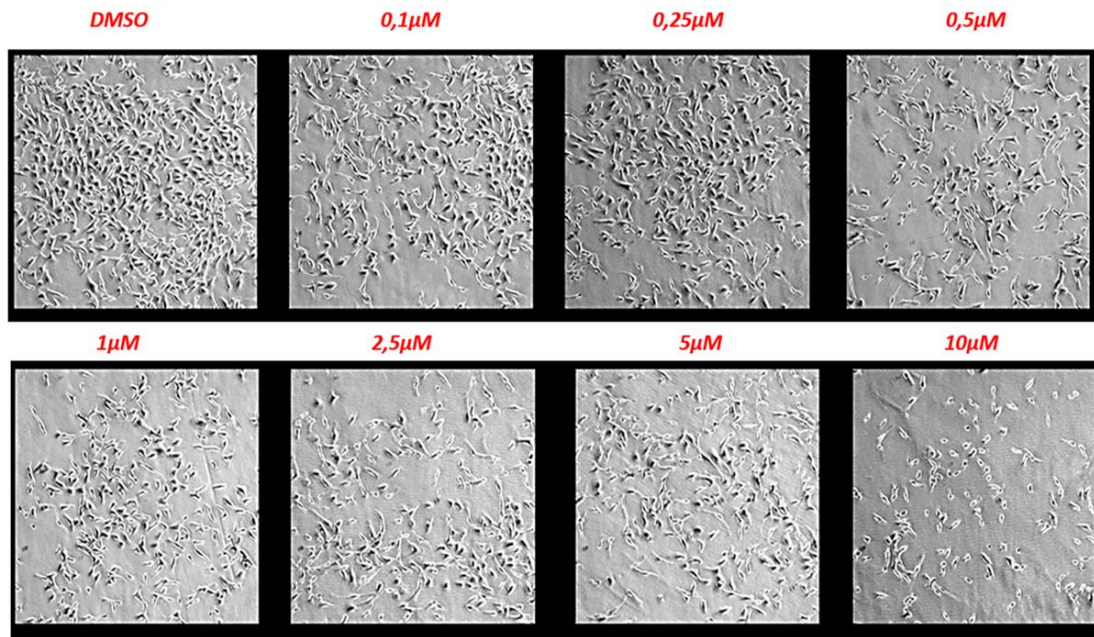
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων που αφορούν την μελέτη και παρατήρηση της κυτταρικής εισόδου/πρόσληψης της ένωσης. Συγκεκριμένα, η ένωση μελετήθηκε στην κυτταρική σειρά DLD1 BRCA2 KD (καρκίνος του παχέος εντέρου) και χρησιμοποιήθηκαν τόσο δείγματα control (χωρίς την προσθήκη της ένωσης), όσο και δείγματα της ένωσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (2,5, 5, 10  $\mu$ M). Στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η χρωστική DAPI, η οποία ειδικεύεται στην χρώση των πυρήνων των κυττάρων και η κυτταρική πρόσληψη ανιχνεύθηκε με την χρήση μικροσκοπίας φθορισμού. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι πως η ένωση εισέρχεται επιτυχώς στο κύτταρο και φαίνεται να εντοπίζεται σε ορισμένα οργανίδια του κυττάρου, ενώ πιθανώς δεν παρατηρείται εντοπισμός στον πυρήνα. Αυτό είναι αρκετά ενθαρρυντικό, καθώς η δοξορουβικίνη είναι ένα μόριο του οποίου η δράση εντοπίζεται εντός του πυρήνα, και έτσι όταν απελευθερωθεί θα αναμένουμε αύξηση της έντασης του φθορισμού σε αυτόν.



Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος της κυτταροτοξικότητας, τόσο για το σύζευγμα χρωστικής-φαρμάκου (TA-38B), όσο και για την απλή χρωστική (TA-38), αλλά και τη δοξορουβικίνη (Dox), μέσω της διαδικασίας Colony Formation Assay, στην καρκινική κυτταρική σειρά γλοιοβλαστώματος U-87 MG. Αξίζει να αναφερθεί πως έγινε προσθήκη διαλύματος χρωστικής Crystal Violet, ενώ μετά από λίγο χρόνο έγινε έκπλυση των plate με νερό. Η βιωσιμότητα των κυττάρων παρατηρήθηκε σε μικροσκόπιο μετά από 5 ημέρες. Παρατηρήθηκε ότι όντως η δοξορουβικίνη οδήγησε σε θάνατο σχεδόν το 90% των κυττάρων σε συγκέντρωση 1  $\mu$ M, ενώ η ένωση TA-38B εμφάνισε μία τιμή  $IC_{50}$  της τάξης 5-10  $\mu$ M, γεγονός που καταδεικνύει πως πιθανώς η TA-38B λειτουργεί ως προφάρμακο.



## TA-38B



**Παρατήρηση:** Αναμένεται επανάληψη των εν λόγω πειραμάτων, καθώς επίσης και κάποια συμπληρωματικά πειράματα.



---

## Βιβλιογραφία

---

- [1] R. L. Siegel, K. D. Miller, H. E. Fuchs, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2022," *CA Cancer J Clin*, vol. 72, no. 1, pp. 7–33, 2022, doi: 10.3322/caac.21708.
- [2] "1) <https://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/cancer/page4> National cancer institute," p. 4.
- [3] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The Hallmarks of Cancer Review Douglas," *Cell*, vol. 100, no. 7, pp. 57–70, 2000.
- [4] A. Compagni and G. Christofori, "Recent advances in research on multistage tumorigenesis," *Br J Cancer*, vol. 83, no. 1, pp. 1–5, 2000, doi: 10.1054/bjoc.2000.1309.
- [5] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [6] N. A. Bhowmick, E. G. Neilson, and H. L. Moses, "Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression," *Nature*, vol. 432, no. 7015, pp. 332–337, 2004, doi: 10.1038/nature03096.
- [7] M. Rashighi and J. E. Harris, "乳鼠心肌提取 HHS Public Access," *Physiol Behav*, vol. 176, no. 3, pp. 139–148, 2017, doi: 10.1053/j.gastro.2016.08.014.CagY.
- [8] R. Dhanasekaran, A. Deutzmann, W. D. Mahauad-Fernandez, A. S. Hansen, A. M. Gouw, and D. W. Felsher, "The MYC oncogene — the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion," *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 19, no. 1, pp. 23–36, 2022, doi: 10.1038/s41571-021-00549-2.
- [9] J. M. Adams and S. Cory, "The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy," *Oncogene*, vol. 26, no. 9, pp. 1324–1337, 2007, doi: 10.1038/sj.onc.1210220.
- [10] D. A. Fruman, H. Chiu, B. D. Hopkins, S. Bagrodia, L. C. Cantley, and R. T. Abraham, "The PI3K Pathway in Human Disease," *Cell*, vol. 170, no. 4, pp. 605–635, 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.07.029.
- [11] A. Norman, "On the origin of cancer foci," *Cancer*, vol. 5, no. 3, pp. 581–582, 1952, doi: 10.1002/1097-0142(195205)5:3<581::AID-CNCR2820050319>3.0.CO;2-Q.
- [12] S. Annett, G. Moore, and T. Robson, "Obesity and cancer metastasis: Molecular and translational perspectives," *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 12, pp. 1–30, 2020, doi: 10.3390/cancers12123798.
- [13] J. Fares, M. Y. Fares, H. H. Khachfe, H. A. Salhab, and Y. Fares, "Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited," *Signal Transduct Target Ther*, vol. 5, no. 1, 2020, doi: 10.1038/s41392-020-0134-x.
- [14] V. Baeriswyl and G. Christofori, "The angiogenic switch in carcinogenesis," *Semin Cancer Biol*, vol. 19, no. 5, pp. 329–337, 2009, doi: 10.1016/j.semcancer.2009.05.003.

- [15] A. E. El-Kenawi and A. B. El-Remessy, "Angiogenesis inhibitors in cancer therapy: Mechanistic perspective on classification and treatment rationales," *Br J Pharmacol*, vol. 170, no. 4, pp. 712–729, 2013, doi: 10.1111/bph.12344.
- [16] M. V Liberti and J. W. Locasale, "The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? (vol 41, pg 211, 2016)," *Trends Biochem Sci*, vol. 41, no. 3, p. 211, 2016, doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.001.The.
- [17] G. Kroemer and J. Pouyssegur, "Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel," *Cancer Cell*, vol. 13, no. 6, pp. 472–482, 2008, doi: 10.1016/j.ccr.2008.05.005.
- [18] H. S. Chae and S. T. Hong, "Overview of Cancer Metabolism and Signaling Transduction," *Int J Mol Sci*, vol. 24, no. 1, 2023, doi: 10.3390/ijms24010012.
- [19] J. H. Park, W. Y. Pyun, and H. W. Park, "Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets," *Cells*, vol. 9, no. 10, 2020, doi: 10.3390/cells9102308.
- [20] S. K. Kim and S. W. Cho, "The Evasion Mechanisms of Cancer Immunity and Drug Intervention in the Tumor Microenvironment," *Front Pharmacol*, vol. 13, no. May, pp. 1–16, 2022, doi: 10.3389/fphar.2022.868695.
- [21] S. Negrini, V. G. Gorgoulis, and T. D. Halazonetis, "Genomic instability an evolving hallmark of cancer," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 11, no. 3, pp. 220–228, 2010, doi: 10.1038/nrm2858.
- [22] D. Hanahan, "Hallmarks of Cancer: New Dimensions," *Cancer Discov*, vol. 12, no. 1, pp. 31–46, 2022, doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- [23] C. Jehanno, M. Vulin, V. Richina, F. Richina, and M. Bentires-Alj, "Phenotypic plasticity during metastatic colonization," *Trends Cell Biol*, vol. 32, no. 10, pp. 854–867, 2022, doi: 10.1016/j.tcb.2022.03.007.
- [24] W. A. Flavahan, E. Gaskell, and B. E. Bernstein, "Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer," *Science (1979)*, vol. 357, no. 6348, 2017, doi: 10.1126/science.aal2380.
- [25] S. B. Baylin and P. A. Jones, "Epigenetic determinants of cancer," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 8, no. 9, pp. 1–35, 2016, doi: 10.1101/cshperspect.a019505.
- [26] S. Ciernikova, A. Sevcikova, V. Stevurkova, and M. Mego, "Tumor microbiome – an integral part of the tumor microenvironment," *Front Oncol*, vol. 12, no. November, pp. 1–20, 2022, doi: 10.3389/fonc.2022.1063100.
- [27] N. M. Anderson and M. C. Simon, "The tumor microenvironment," *Current Biology*, vol. 30, no. 16, pp. R921–R925, 2020, doi: 10.1016/j.cub.2020.06.081.
- [28] W. Yin, J. Wang, L. Jiang, and Y. James Kang, "Cancer and stem cells," *Exp Biol Med*, vol. 246, no. 16, pp. 1791–1801, 2021, doi: 10.1177/15353702211005390.
- [29] B. Muz, P. de la Puente, F. Azab, and A. K. Azab, "The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy," *Hypoxia*, p. 83, 2015, doi: 10.2147/hp.s93413.

- [30] K. Ruan, G. Song, and G. Ouyang, "Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer," *J Cell Biochem*, vol. 107, no. 6, pp. 1053–1062, 2009, doi: 10.1002/jcb.22214.
- [31] W. J. G. Oncol, "World Journal of," vol. 5204, no. 5, 2021.
- [32] B. A. Webb, M. Chimenti, M. P. Jacobson, and D. L. Barber, "Dysregulated pH: A perfect storm for cancer progression," *Nat Rev Cancer*, vol. 11, no. 9, pp. 671–677, 2011, doi: 10.1038/nrc3110.
- [33] G. Hao, Z. P. Xu, and L. Li, "Manipulating extracellular tumour pH: An effective target for cancer therapy," *RSC Adv*, vol. 8, no. 39, pp. 22182–22192, 2018, doi: 10.1039/c8ra02095g.
- [34] P. Swietach, R. D. Vaughan-Jones, A. L. Harris, and A. Hulikova, "The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer," *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 369, no. 1638, 2014, doi: 10.1098/rstb.2013.0099.
- [35] J. Wu, "The enhanced permeability and retention (Epr) effect: The significance of the concept and methods to enhance its application," *J Pers Med*, vol. 11, no. 8, 2021, doi: 10.3390/jpm11080771.
- [36] G. Y. Liou and P. Storz, *Reactive oxygen species in cancer*, vol. 44, no. 5. 2010. doi: 10.3109/10715761003667554.
- [37] H. Nakamura and K. Takada, "Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions," *Cancer Sci*, vol. 112, no. 10, pp. 3945–3952, 2021, doi: 10.1111/cas.15068.
- [38] M. Hornsveld and T. B. Dansen, "The Hallmarks of Cancer from a Redox Perspective," *Antioxid Redox Signal*, vol. 25, no. 6, pp. 300–325, 2016, doi: 10.1089/ars.2015.6580.
- [39] A. Sreedhar and Y. Zhao, "Dysregulated metabolic enzymes and metabolic reprogramming in cancer cells," *Biomed Rep*, vol. 8, no. 1, pp. 3–10, 2018, doi: 10.3892/br.2017.1022.
- [40] Y. Yao, Y. Zhang, C. Yan, W. H. Zhu, and Z. Guo, "Enzyme-activatable fluorescent probes for  $\beta$ -galactosidase: From design to biological applications," *Chem Sci*, vol. 12, no. 29, pp. 9885–9894, 2021, doi: 10.1039/d1sc02069b.
- [41] H. Kubo *et al.*, " $\beta$ -Galactosidase is a target enzyme for detecting peritoneal metastasis of gastric cancer," *Sci Rep*, vol. 11, no. 1, pp. 1–10, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-88982-2.
- [42] 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, pp. 2–9, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-09525-2.
- [43] C. Ma *et al.*, "A minireview of viscosity-sensitive fluorescent probes: Design and biological applications," *J Mater Chem B*, vol. 8, no. 42, pp. 9642–9651, 2020, doi: 10.1039/d0tb01146k.
- [44] 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, pp. 6880–6898, 2021, doi: 10.1002/chem.202004888.

- [45] A. Silswal, A. Kanojiya, and A. L. Koner, "A Fluorogenic Far Red-Emitting Molecular Viscometer for Ascertaining Lysosomal Stress in Live Cells and *Caenorhabditis elegans*," *Front Chem*, vol. 10, no. March, pp. 1–9, 2022, doi: 10.3389/fchem.2022.840297.
- [46] H. Li *et al.*, "A mitochondria-targeted two-photon fluorogenic probe for the dual-imaging of viscosity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in Parkinson's disease models," *J Mater Chem B*, vol. 7, no. 27, pp. 4243–4251, 2019, doi: 10.1039/c9tb00576e.
- [47] Y. Wu, C. Yin, W. Zhang, Y. Zhang, and F. Huo, "Mitochondrial-Targeting Near-Infrared Fluorescent Probe for Visualizing Viscosity in Drug-Induced Cells and a Fatty Liver Mouse Model," *Anal Chem*, vol. 94, no. 12, pp. 5069–5074, 2022, doi: 10.1021/acs.analchem.1c05288.
- [48] T. Schweizer, H. Kubach, and T. Koch, "Investigations to characterize the interactions of light radiation, engine operating media and fluorescence tracers for the use of qualitative light-induced fluorescence in engine systems," *Automotive and Engine Technology*, vol. 6, no. 3–4, pp. 275–287, 2021, doi: 10.1007/s41104-021-00092-3.
- [49] H. Kang, M. W. Kang, S. Kashiwagi, and H. S. Choi, "NIR fluorescence imaging and treatment for cancer immunotherapy," *J Immunother Cancer*, vol. 10, no. 7, pp. 1–12, 2022, doi: 10.1136/jitc-2022-004936.
- [50] Q. Wei *et al.*, "Recent Advances of NIR-II Emissive Semiconducting Polymer Dots for In Vivo Tumor Fluorescence Imaging and Theranostics," *Biosensors (Basel)*, vol. 12, no. 12, pp. 1–18, 2022, doi: 10.3390/bios12121126.
- [51] Y. Jiao, B. Zhu, J. Chen, and X. Duan, "Fluorescent sensing of fluoride in cellular system," *Theranostics*, vol. 5, no. 2, pp. 173–187, 2015, doi: 10.7150/thno.9860.
- [52] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd Principles of fluorescence spectroscopy, Springer, New York, USA, 3rd edn, 2006*. 2006. doi: 10.1007/978-0-387-46312-4.
- [53] Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz, and W. Rettig, "Structural Changes Accompanying Intramolecular Electron Transfer: Focus on Twisted Intramolecular Charge-Transfer States and Structures," *Chem Rev*, vol. 103, no. 10, pp. 3899–4031, 2003, doi: 10.1021/cr940745l.
- [54] G. P. C. Drummen, "Fluorescent probes and fluorescence (microscopy) techniques-illuminating biological and biomedical research," *Molecules*, vol. 17, no. 12, pp. 14067–14090, 2012, doi: 10.3390/molecules171214067.
- [55] A. Pal, M. Karmakar, S. R. Bhatta, and A. Thakur, "A detailed insight into anion sensing based on intramolecular charge transfer (ICT) mechanism: A comprehensive review of the years 2016 to 2021," *Coord Chem Rev*, vol. 448, p. 214167, 2021, doi: 10.1016/j.ccr.2021.214167.
- [56] R. Misra and S. P. Bhattacharyya, "Brief History of ICT Molecules," *Intramolecular Charge Transfer*, pp. 29–69, 2018, doi: 10.1002/9783527801916.ch2.
- [57] H. Niu, J. Liu, H. M. O'Connor, T. Gunnlaugsson, T. D. James, and H. Zhang, "Photoinduced electron transfer (PeT) based fluorescent probes for cellular imaging

- and disease therapy," *Chem Soc Rev*, vol. 52, no. 7, pp. 2322–2357, 2023, doi: 10.1039/d1cs01097b.
- [58] R. B. Sekar and A. Periasamy, "Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations," *Journal of Cell Biology*, vol. 160, no. 5, pp. 629–633, 2003, doi: 10.1083/jcb.200210140.
- [59] and J. Z. Linlin Ma, Fan Yang, "Application of fluorescence resonance energy transfer in protein studies," *J Mol Struct*, vol. 25, no. 8, pp. 713–724, 2015, doi: 10.1016/j.molstruc.2013.12.071.Application.
- [60] C. Souza, D. S. Pellosi, and A. C. Tedesco, "Prodrugs for targeted cancer therapy," *Expert Review of Anticancer Therapy*, vol. 19, no. 6. Taylor and Francis Ltd, pp. 483–502, Jun. 03, 2019. doi: 10.1080/14737140.2019.1615890.
- [61] I. Giang, E. L. Boland, and G. M. K. Poon, "Prodrug applications for targeted cancer therapy," *AAPS Journal*, vol. 16, no. 5. Springer New York LLC, pp. 899–913, 2014. doi: 10.1208/s12248-014-9638-z.
- [62] C. Coelho *et al.*, "Design Principles Governing the Development of Theranostic Anticancer Agents and Their Nanoformulations with Photoacoustic Properties," 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics.
- [63] V. Borse, P. Chandra, and R. Srivastava, "BioSensing, Theranostics, and Medical Devices."
- [64] R. Sheyi, B. G. de la Torre, and F. Albericio, "Linkers: An Assurance for Controlled Delivery of Antibody-Drug Conjugate," *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 2. MDPI, Feb. 01, 2022. doi: 10.3390/pharmaceutics14020396.
- [65] M. Srinivasarao, C. V. Galliford, and P. S. Low, "Principles in the design of ligand-targeted cancer therapeutics and imaging agents," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 14, no. 3. Nature Publishing Group, pp. 203–219, Mar. 04, 2015. doi: 10.1038/nrd4519.
- [66] S. Alam Khan and M. Jawaid Akhtar, "Structural modification and strategies for the enhanced doxorubicin drug delivery," *Bioorganic Chemistry*, vol. 120. Academic Press Inc., Mar. 01, 2022. doi: 10.1016/j.bioorg.2022.105599.
- [67] C. F. Thorn *et al.*, "Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects," *Pharmacogenet Genomics*, vol. 21, no. 7, pp. 440–446, 2011, doi: 10.1097/FPC.0b013e32833ffb56.
- [68] O. Tacar, P. Sriamornsak, and C. R. Dass, "Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 65, no. 2. pp. 157–170, Feb. 2013. doi: 10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x.
- [69] A. Reis-Mendes, F. Carvalho, F. Remião, E. Sousa, M. D. L. Bastos, and V. M. Costa, "The main metabolites of fluorouracil + adriamycin + cyclophosphamide (FAC) are not major contributors to FAC toxicity in H9C2 cardiac differentiated cells," *Biomolecules*, vol. 9, no. 3, Mar. 2019, doi: 10.3390/biom9030098.

- [70] S. Peter, S. Alven, R. B. Maseko, and B. A. Aderibigbe, "Doxorubicin-Based Hybrid Compounds as Potential Anticancer Agents: A Review," *Molecules*, vol. 27, no. 14. MDPI, Jul. 01, 2022. doi: 10.3390/molecules27144478.
- [71] M. Denel-Bobrowska and A. Marczak, "Structural modifications in the sugar moiety as a key to improving the anticancer effectiveness of doxorubicin," *Life Sciences*, vol. 178. Elsevier Inc., pp. 1–8, Jun. 01, 2017. doi: 10.1016/j.lfs.2017.04.009.
- [72] V. Hanušová, I. Boušová, and L. Skálová, "Possibilities to increase the effectiveness of doxorubicin in cancer cells killing," *Drug Metabolism Reviews*, vol. 43, no. 4. pp. 540–557, Nov. 2011. doi: 10.3109/03602532.2011.609174.
- [73] S. Asadi and G. Mohammadi Ziarani, "The molecular diversity scope of 1,3-indandione in organic synthesis," *Molecular Diversity*, vol. 20, no. 1. Springer International Publishing, pp. 111–152, Feb. 01, 2016. doi: 10.1007/s11030-015-9589-z.
- [74] T. M. Kadayat *et al.*, "Hydroxylated 2,4-diphenyl indenopyridine derivatives as a selective non-intercalative topoisomerase catalytic inhibitor," *Eur J Med Chem*, vol. 90, pp. 302–314, 2015, doi: 10.1016/j.ejmech.2014.11.046.
- [75] S. Park *et al.*, "Novel 2-aryl-4-(4'-hydroxyphenyl)-5H-indeno[1,2-b]pyridines as potent DNA non-intercalative topoisomerase catalytic inhibitors," *Eur J Med Chem*, vol. 125, pp. 14–28, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.ejmech.2016.09.019.
- [76] A. Shrestha *et al.*, "Di-indenopyridines as topoisomerase II-selective anticancer agents: Design, synthesis, and structure–activity relationships," *Bioorg Med Chem*, vol. 91, Aug. 2023, doi: 10.1016/j.bmc.2023.117403.
- [77] M. Tugrak, H. Inci Gul, H. Sakagami, I. Gulcin, and C. T. Supuran, "New azafluorenones with cytotoxic and carbonic anhydrase inhibitory properties: 2-Aryl-4-(4-hydroxyphenyl)-5H-indeno[1,2-b]pyridin-5-ones," *Bioorg Chem*, vol. 81, pp. 433–439, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.bioorg.2018.09.013.
- [78] S. Tu, B. Jiang, R. Jia, J. Zhang, and Y. Zhang, "An efficient and expeditious microwave-assisted synthesis of 4-azafluorenones via a multi-component reaction," *Tetrahedron Lett*, vol. 48, no. 8, pp. 1369–1374, Feb. 2007, doi: 10.1016/j.tetlet.2006.12.102.
- [79] T. M. Kadayat, C. Song, Y. Kwon, and E. S. Lee, "Modified 2,4-diaryl-5H-indeno[1,2-b]pyridines with hydroxyl and chlorine moiety: Synthesis, anticancer activity, and structure-activity relationship study," *Bioorg Chem*, vol. 62, pp. 30–40, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.bioorg.2015.07.002.
- [80] S. Das, "Recent applications of 1,3-indanedione in organic transformations for the construction of fused- and spiro scaffolds," *Tetrahedron*, vol. 122. Elsevier Ltd, Sep. 10, 2022. doi: 10.1016/j.tet.2022.132954.
- [81] F. Shi, S. Zhang, S. S. Wu, Y. Gao, and S. J. Tu, "A diversity-oriented synthesis of pyrazolo[4,3-f]quinoline derivatives with potential bioactivities via microwave-assisted multi-component reactions," *Mol Divers*, vol. 15, no. 2, pp. 497–505, May 2011, doi: 10.1007/s11030-010-9272-3.

- [82] M. Henary, C. Kananda, L. Rotolo, B. Savino, E. A. Owens, and G. Cravotto, "Benefits and applications of microwave-assisted synthesis of nitrogen containing heterocycles in medicinal chemistry," *RSC Advances*, vol. 10, no. 24. Royal Society of Chemistry, pp. 14170–14197, Apr. 07, 2020. doi: 10.1039/d0ra01378a.
- [83] K. Martina, G. Cravotto, and R. S. Varma, "Impact of Microwaves on Organic Synthesis and Strategies toward Flow Processes and Scaling up," *Journal of Organic Chemistry*, vol. 86, no. 20. American Chemical Society, pp. 13857–13872, Oct. 15, 2021. doi: 10.1021/acs.joc.1c00865.
- [84] M. B. Gawande, S. N. Shelke, R. Zboril, and R. S. Varma, "Microwave-assisted chemistry: Synthetic applications for rapid assembly of nanomaterials and organics," *Acc Chem Res*, vol. 47, no. 4, pp. 1338–1348, Apr. 2014, doi: 10.1021/ar400309b.
- [85] A. Gaspar, M. J. Matos, J. Garrido, E. Uriarte, and F. Borges, "Chromone: A valid scaffold in medicinal chemistry," *Chem Rev*, vol. 114, no. 9, pp. 4960–4992, 2014, doi: 10.1021/cr400265z.
- [86] X. Duan, Q. Tong, C. Fu, and L. Chen, "Lysosome-targeted fluorescent probes: Design mechanism and biological applications," *Bioorganic Chemistry*, vol. 140. Academic Press Inc., Nov. 01, 2023. doi: 10.1016/j.bioorg.2023.106832.
- [87] K. Takao *et al.*, "2-Styrylchromone derivatives as potent and selective monoamine oxidase B inhibitors," *Bioorg Chem*, vol. 92, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.bioorg.2019.103285.
- [88] "Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies (by G. Gomori)."
- [89] D. Agudelo, P. Bourassa, G. Bérubé, and H. A. Tajmir-Riahi, "Intercalation of antitumor drug doxorubicin and its analogue by DNA duplex: Structural features and biological implications," *Int J Biol Macromol*, vol. 66, pp. 144–150, 2014, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.02.028.
- [90] D. Agudelo, P. Bourassa, G. Bérubé, and H. A. Tajmir-Riahi, "Review on the binding of anticancer drug doxorubicin with DNA and tRNA: Structural models and antitumor activity," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 158. Elsevier B.V., pp. 274–279, May 01, 2016. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.02.032.
- [91] F. Yang, S. S. Teves, C. J. Kemp, and S. Henikoff, "Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics," *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, vol. 1845, no. 1. pp. 84–89, Jan. 2014. doi: 10.1016/j.bbcan.2013.12.002.
- [92] S. Mahesh, K. C. Tang, and M. Raj, "Amide bond activation of biological molecules," *Molecules*, vol. 23, no. 10, Oct. 2018, doi: 10.3390/molecules23102615.
- [93] M. K. Shim *et al.*, "Carrier-free nanoparticles of cathepsin B-cleavable peptide-conjugated doxorubicin prodrug for cancer targeting therapy," *Journal of Controlled Release*, vol. 294, pp. 376–389, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.jconrel.2018.11.032.
- [94] Z. Cao *et al.*, "pH- and enzyme-triggered drug release as an important process in the design of anti-tumor drug delivery systems," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 118. Elsevier Masson SAS, Oct. 01, 2019. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109340.

- [95] Y. J. Zhong, L. H. Shao, and Y. Li, "Cathepsin B-cleavable doxorubicin prodrugs for targeted cancer therapy (Review)," *International Journal of Oncology*, vol. 42, no. 2. pp. 373–383, Feb. 2013. doi: 10.3892/ijo.2012.1754.
- [96] M. Mielczarek-Puta, M. Struga, and P. Roszkowski, "Synthesis and anticancer effects of conjugates of doxorubicin and unsaturated fatty acids (LNA and DHA)," *Medicinal Chemistry Research*, vol. 28, no. 12, pp. 2153–2164, Dec. 2019, doi: 10.1007/s00044-019-02443-0.
- [97] D. R. Sudhan and D. W. Siemann, "Cathepsin L targeting in cancer treatment," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 155. Elsevier Inc., pp. 105–116, Nov. 01, 2015. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.08.007.
- [98] H. Zhao, J. Yu, R. Zhang, P. Chen, H. Jiang, and W. Yu, "Doxorubicin prodrug-based nanomedicines for the treatment of cancer," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 258. Elsevier Masson s.r.l., Oct. 05, 2023. doi: 10.1016/j.ejmech.2023.115612.
- [99] Z. Wu, C. Liu, Z. Zhang, R. Zheng, and Y. Zheng, "Amidase as a versatile tool in amide-bond cleavage: From molecular features to biotechnological applications," *Biotechnology Advances*, vol. 43. Elsevier Inc., Nov. 01, 2020. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107574.
- [100] M. Alas, A. Saghaeidehkordi, and K. Kaur, "Peptide-Drug Conjugates with Different Linkers for Cancer Therapy," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 64, no. 1. American Chemical Society, pp. 216–232, Jan. 14, 2021. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c01530.
- [101] M. Mielczarek-Puta, M. Struga, and P. Roszkowski, "Synthesis and anticancer effects of conjugates of doxorubicin and unsaturated fatty acids (LNA and DHA)," *Medicinal Chemistry Research*, vol. 28, no. 12, pp. 2153–2164, Dec. 2019, doi: 10.1007/s00044-019-02443-0.
- [102] B. S. Chhikara, N. St. Jean, D. Mandal, A. Kumar, and K. Parang, "Fatty acyl amide derivatives of doxorubicin: Synthesis and in vitro anticancer activities," *Eur J Med Chem*, vol. 46, no. 6, pp. 2037–2042, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.ejmech.2011.02.056.
- [103] A. Vigevani and M. J. Williamson, "Aristide Vigevani, Martin J. Williamson, Doxorubicin, Analytical Profiles of Drug Substances, Academic Press, Volume 9, 1981, Pages 245-274, [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(08\)60143-4](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(08)60143-4)."
- [104] Á. Szabó, J. Szöllősi, and P. Nagy, "Principles of Resonance Energy Transfer," *Curr Protoc*, vol. 2, no. 12, Dec. 2022, doi: 10.1002/cpz1.625.
- [105] C. Thaler, S. V. Koushik, P. S. Blank, and S. S. Vogel, "Quantitative multiphoton spectral imaging and its use for measuring resonance energy transfer," *Biophys J*, vol. 89, no. 4, pp. 2736–2749, 2005, doi: 10.1529/biophysj.105.061853.
- [106] N. Chams *et al.*, "COVID-19: A Multidisciplinary Review," *Front Public Health*, vol. 8, no. July, pp. 1–20, 2020, doi: 10.3389/fpubh.2020.00383.
- [107] Y. F. Tu *et al.*, "A review of sars-cov-2 and the ongoing clinical trials," *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 7, 2020, doi: 10.3390/ijms21072657.



- [108] M. M. Lamers and B. L. Haagmans, "SARS-CoV-2 pathogenesis," *Nat Rev Microbiol*, vol. 20, no. 5, pp. 270–284, 2022, doi: 10.1038/s41579-022-00713-0.
- [109] C. L. Atzrodt *et al.*, "A Guide to COVID-19: a global pandemic caused by the novel coronavirus SARS-CoV-2," *FEBS Journal*, vol. 287, no. 17, pp. 3633–3650, 2020, doi: 10.1111/febs.15375.
- [110] G. Mariano, R. J. Farthing, S. L. M. Lale-Farjat, and J. R. C. Bergeron, "Structural Characterization of SARS-CoV-2: Where We Are, and Where We Need to Be," *Front Mol Biosci*, vol. 7, no. December, 2020, doi: 10.3389/fmolb.2020.605236.
- [111] "<https://covid19.macmillanlearning.com/>".
- [112] R. Yadav, J. K. Chaudhary, N. Jain, and P. K. Chaudhary, "Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic," *Cells*, vol. 10, no. 4, p. 821, 2021.
- [113] A. Beig Parikhani *et al.*, "The Inclusive Review on SARS-CoV-2 Biology, Epidemiology, Diagnosis, and Potential Management Options," *Curr Microbiol*, vol. 78, no. 4, pp. 1099–1114, 2021, doi: 10.1007/s00284-021-02396-x.
- [114] A. Sharma, I. Ahmad Farouk, and S. K. Lal, "Covid-19: A review on the novel coronavirus disease evolution, transmission, detection, control and prevention," *Viruses*, vol. 13, no. 2, pp. 1–25, 2021, doi: 10.3390/v13020202.
- [115] M. Jahirul Islam, N. Nawal Islam, M. Siddik Alom, M. Kabir, and M. A. Halim, "A review on structural, non-structural, and accessory proteins of SARS-CoV-2: Highlighting drug target sites," *Immunobiology*, vol. 228, no. 1, p. 152302, 2023, doi: 10.1016/j.imbio.2022.152302.
- [116] B. Hu, H. Guo, P. Zhou, and Z. L. Shi, "Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19," *Nat Rev Microbiol*, vol. 19, no. 3, pp. 141–154, 2021, doi: 10.1038/s41579-020-00459-7.
- [117] M. T. Khan *et al.*, "Structures of SARS-CoV-2 RNA-Binding Proteins and Therapeutic Targets," *Intervirology*, vol. 64, no. 2, pp. 55–68, 2021, doi: 10.1159/000513686.
- [118] S. Kakavandi *et al.*, "Structural and non-structural proteins in SARS-CoV-2: potential aspects to COVID-19 treatment or prevention of progression of related diseases," *Cell Communication and Signaling*, vol. 21, no. 1, pp. 1–31, 2023, doi: 10.1186/s12964-023-01104-5.
- [119] "Casella M^J Rajnik M^J Aleem A^J Dulebohn SC^J Di Napoli R. Features^J Evaluation^J and Treatment of Coronavirus (COVID-19)".
- [120] R. Raj, "Analysis of non-structural proteins, NSPs of SARS-CoV-2 as targets for computational drug designing," *Biochem Biophys Rep*, vol. 25, p. 100847, 2021, doi: 10.1016/j.bbrep.2020.100847.
- [121] W. Yan, Y. Zheng, X. Zeng, B. He, and W. Cheng, "Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies," *Signal Transduct Target Ther*, vol. 7, no. 1, 2022, doi: 10.1038/s41392-022-00884-5.

- [122] J. A. Newman *et al.*, “Structure, mechanism and crystallographic fragment screening of the SARS-CoV-2 NSP13 helicase,” *Nat Commun*, vol. 12, no. 1, pp. 1–11, 2021, doi: 10.1038/s41467-021-25166-6.
- [123] A. Russ *et al.*, “Nsp16 shields SARS-CoV-2 from efficient MDA5 sensing and IFIT1-mediated restriction,” *EMBO Rep*, vol. 23, no. 12, pp. 1–15, 2022, doi: 10.15252/embr.202255648.
- [124] M. Hackbart, X. Deng, and S. C. Baker, “Coronavirus endoribonuclease targets viral polyuridine sequences to evade activating host sensors,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 117, no. 14, pp. 8094–8103, 2020, doi: 10.1073/pnas.1921485117.
- [125] O. Motwalli and M. Alazmi, “Analysis of natural compounds against the activity of SARS-CoV-2 NSP15 protein towards an effective treatment against COVID-19: a theoretical and computational biology approach”, doi: 10.1007/s00894-021-04750-z/Published.
- [126] K. Bhardwaj, J. Sun, A. Holzenburg, L. A. Guarino, and C. C. Kao, “RNA Recognition and Cleavage by the SARS Coronavirus Endoribonuclease,” *J Mol Biol*, vol. 361, no. 2, pp. 243–256, 2006, doi: 10.1016/j.jmb.2006.06.021.
- [127] Z. Y. Low, N. Z. Zabidi, A. J. W. Yip, A. Puniyamurti, V. T. K. Chow, and S. K. Lal, “SARS-CoV-2 Non-Structural Proteins and Their Roles in Host Immune Evasion,” *Viruses*, vol. 14, no. 9, pp. 1–27, 2022, doi: 10.3390/v14091991.
- [128] M. N. Frazier *et al.*, “Characterization of SARS2 Nsp15 nuclease activity reveals it’s mad about U,” *Nucleic Acids Res*, vol. 49, no. 17, pp. 10136–10149, 2021, doi: 10.1093/nar/gkab719.
- [129] L. A. Guarino, K. Bhardwaj, W. Dong, J. Sun, A. Holzenburg, and C. Kao, “Mutational analysis of the SARS virus Nsp15 endoribonuclease: Identification of residues affecting hexamer formation,” *J Mol Biol*, vol. 353, no. 5, pp. 1106–1117, 2005, doi: 10.1016/j.jmb.2005.09.007.
- [130] M. Saramago *et al.*, “The nsp15 Nuclease as a Good Target to Combat SARS-CoV-2: Mechanism of Action and Its Inactivation with FDA-Approved Drugs,” *Microorganisms*, vol. 10, no. 2, 2022, doi: 10.3390/microorganisms10020342.
- [131] B. Canal *et al.*, “Identifying SARS-CoV-2 antiviral compounds by screening for small molecule inhibitors of nsp15 endoribonuclease,” *Biochemical Journal*, vol. 478, no. 13, pp. 2465–2479, 2021, doi: 10.1042/BCJ20210199.
- [132] J. Athmer, A. R. Fehr, M. Grunewald, E. C. Smith, M. R. Denison, and S. Perlman, “In situ tagged nsp15 reveals interactions with coronavirus replication/transcription complex associated proteins,” *mBio*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, 2017, doi: 10.1128/mBio.02320-16.
- [133] M. C. Pillon *et al.*, “Cryo-EM structures of the SARS-CoV-2 endoribonuclease Nsp15 reveal insight into nuclease specificity and dynamics,” *Nat Commun*, vol. 12, no. 1, pp. 1–12, 2021, doi: 10.1038/s41467-020-20608-z.

- [134] I. M. Wilson, M. N. Frazier, J. L. Li, T. A. Randall, and R. E. Stanley, "Biochemical Characterization of Emerging SARS-CoV-2 Nsp15 Endoribonuclease Variants," *J Mol Biol*, vol. 434, no. 20, p. 167796, 2022, doi: 10.1016/j.jmb.2022.167796.
- [135] N. Redondo, S. Zaldívar-López, J. J. Garrido, and M. Montoya, "SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns," *Frontiers in Immunology*, vol. 12. Frontiers Media S.A., Jul. 07, 2021. doi: 10.3389/fimmu.2021.708264.
- [136] B. D. López-Ayllón *et al.*, "SARS-CoV-2 accessory proteins involvement in inflammatory and profibrotic processes through IL11 signaling," *Front Immunol*, vol. 14, 2023, doi: 10.3389/fimmu.2023.1220306.
- [137] P. Fang, L. Fang, H. Zhang, S. Xia, and S. Xiao, "Functions of coronavirus accessory proteins: Overview of the state of the art," *Viruses*, vol. 13, no. 6, Jun. 2021, doi: 10.3390/v13061139.
- [138] M. Zandi *et al.*, "The role of SARS-CoV-2 accessory proteins in immune evasion," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 156. Elsevier Masson s.r.l., Dec. 01, 2022. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113889.
- [139] M. Mohamadian, H. Chiti, A. Shoghli, S. Biglari, N. Parsamanesh, and A. Esmaeilzadeh, "COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis," *Journal of Gene Medicine*, vol. 23, no. 2, pp. 1–11, 2021, doi: 10.1002/jgm.3303.
- [140] Grey, M. Y. Abou-ismail, A. Diamond, S. Kapoor, and Y. Arafah, "COVID-19 vaccines: The status and perspectives in delivery points of view," *Psychiatry Res*, vol. 14(4), no. January, p. 293, 2020.
- [141] V. E. Hillary and S. A. Ceasar, "An update on COVID-19: SARS-CoV-2 variants, antiviral drugs, and vaccines," *Heliyon*, vol. 9, no. 3, p. e13952, 2023, doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e13952.
- [142] L. Grigoryan and B. Pulendran, "The immunology of SARS-CoV-2 infections and vaccines," *Semin Immunol*, vol. 50, no. September, p. 101422, 2020, doi: 10.1016/j.smim.2020.101422.
- [143] J. S. Tregoning, K. E. Flight, S. L. Higham, Z. Wang, and B. F. Pierce, "Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape," *Nat Rev Immunol*, vol. 21, no. 10, pp. 626–636, 2021, doi: 10.1038/s41577-021-00592-1.
- [144] M. M. Rahman, M. H. U. Masum, S. Wajed, and A. Talukder, "A comprehensive review on COVID-19 vaccines: development, effectiveness, adverse effects, distribution and challenges," *Virusdisease*, vol. 33, no. 1, pp. 1–22, 2022, doi: 10.1007/s13337-022-00755-1.
- [145] Y. Kim *et al.*, "Tipiracil binds to uridine site and inhibits Nsp15 endoribonuclease NendoU from SARS-CoV-2," *Commun Biol*, vol. 4, no. 1, pp. 1–11, 2021, doi: 10.1038/s42003-021-01735-9.
- [146] B. V Silva, P. M. Esteves, and A. C. Pinto, "Chlorination of Isatins with Trichloroisocyanuric Acid," 2011.

- [147] M. S. Shmidt, A. M. Reverdito, L. Kremenichuzky, I. A. Perillo, and M. M. Blanco, "Simple and Efficient Microwave Assisted N-Alkylation of Isatin," *Molecules*, vol. 13, pp. 831–840, 2008, [Online]. Available: [www.mdpi.org/molecules](http://www.mdpi.org/molecules)
- [148] R. K. Thakur *et al.*, "Synthesis of isatin based N1-alkylated 3- $\beta$ -C-glycoconjugated-oxopropylidene oxindoles as potent antiplasmodial agents," *Eur J Med Chem*, vol. 162, pp. 448–454, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.ejmech.2018.11.008.
- [149] S. J. Kalita and D. C. Deka, "A Molecular Hybridization Approach for Simple and Expedient Synthesis of Novel Spiro[oxindoline-3, 4'-isoxazolo[5, 4-b]pyrazolo[4, 3-e]pyridines] in Water," *ChemistrySelect*, vol. 3, no. 27, pp. 7862–7866, Jul. 2018, doi: 10.1002/slct.201801545.
- [150] 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. Future Medicine Ltd., pp. 2713–2727, Dec. 01, 2018. doi: 10.4155/fmc-2018-0252.
- [151] X. Wang, Y. Wang, X. Li, Z. Yu, C. Song, and Y. Du, "Nitrile-containing pharmaceuticals: target, mechanism of action, and their SAR studies," *RSC Medicinal Chemistry*, vol. 12, no. 10. Royal Society of Chemistry, pp. 1650–1671, Oct. 01, 2021. doi: 10.1039/d1md00131k.
- [152] Y. Kim *et al.*, "Tipiracil binds to uridine site and inhibits Nsp15 endoribonuclease NendoU from SARS-CoV-2," *Commun Biol*, vol. 4, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/s42003-021-01735-9.
- [153] P. C. Agu *et al.*, "Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management," *Sci Rep*, vol. 13, no. 1, Dec. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-40160-2.
- [154] X.-Y. Meng, H.-X. Zhang, M. Mezei, and M. Cui, "Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery."
- [155] M. Mohanty and P. S. Mohanty, "Molecular docking in organic, inorganic, and hybrid systems: a tutorial review," *Monatshefte fur Chemie*, vol. 154, no. 7. Springer, pp. 683–707, Jul. 01, 2023. doi: 10.1007/s00706-023-03076-1.
- [156] J. Sgrignani, B. Novati, G. Colombo, and G. Grazioso, "Covalent docking of selected boron-based serine beta-lactamase inhibitors," *J Comput Aided Mol Des*, vol. 29, no. 5, pp. 441–450, May 2015, doi: 10.1007/s10822-015-9834-7.
- [157] P. J. Goodford, "Goodford PJ. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem*. 1985 Jul;28(7):849-57. doi: 10.1021/jm00145a002. PMID: 3892003.," London, 1985. [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- [158] 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. Future Medicine Ltd., pp. 2713–2727, Dec. 01, 2018. doi: 10.4155/fmc-2018-0252.
- [159] J. M. G. O. Ferreira, J. B. M. De Resende Filho, P. K. Batista, E. E. S. Teotonio, and J. A. Vale, "Rapid and efficient uncatalyzed Knoevenagel condensations from binary

- mixture of ethanol and water," *J Braz Chem Soc*, vol. 29, no. 7, pp. 1382–1387, 2018, doi: 10.21577/0103-5053.20170240.
- [160] C. Xu, J. K. Bartley, D. I. Enache, D. W. Knight, and G. J. Hutchings, "High surface area MgO as a highly effective heterogeneous base catalyst for michael addition and knoevenagel condensation reactions," *Synthesis (Stuttg)*, no. 19, pp. 3468–3476, Dec. 2005, doi: 10.1055/s-2005-918467.
- [161] X. J. Yang and Y. Sen Zhang, "Molecular iodine: A powerful catalyst for the knoevenagel condensation of isatins with malononitrile," *J Chem*, 2013, doi: 10.1155/2013/543219.
- [162] R. S. Bhupathi, B. Madhu, C. V. R. Reddy, B. R. Devi, and P. K. Dubey, "Ionic Liquid Mediated Green Synthesis of Spirooxindoles from N-methyl Quinolones and Their Anti Bacterial Activity," *J Heterocycl Chem*, vol. 54, no. 4, pp. 2326–2332, Jul. 2017, doi: 10.1002/jhet.2821.
- [163] J. Devi, S. J. Kalita, and D. C. Deka, "A Quick Micelle-Catalyzed One-Pot Synthesis of Spiro[indoline-3, 4'-pyrano[2, 3-c]pyrazoles] in Water at Room Temperature," *ChemistrySelect*, vol. 3, no. 5, pp. 1512–1516, Feb. 2018, doi: 10.1002/slct.201702716.
- [164] Z. Sadeghian and M. Bayat, "Green synthesis of isatin-based compounds," *Research on Chemical Intermediates*, vol. 48, no. 10. Springer Science and Business Media B.V., pp. 3987–4016, Oct. 01, 2022. doi: 10.1007/s11164-022-04817-3.
- [165] J. M. G. de O. Ferreira, G. A. da Silva, M. C. Coelho, C. G. L. Junior, and J. A. Vale, "Quick synthesis of isatin-derived knoevenagel adducts using only eco-friendly solvent," *Results Chem*, vol. 3, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.rechem.2021.100135.
- [166] S. M. Mousavi, M. Zarei, S. A. Hashemi, A. Babapoor, and A. M. Amani, "A conceptual review of rhodanine: current applications of antiviral drugs, anticancer and antimicrobial activities," *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, vol. 47, no. 1. Taylor and Francis Ltd., pp. 1132–1148, Dec. 04, 2019. doi: 10.1080/21691401.2019.1573824.
- [167] R. Upadhyay, Z. Khalifa, D. Patel, and A. B. Patel, "Rhodanine-Incorporated Indole Derivatives as Pharmacologically Vital Hybrids," *ChemistrySelect*, vol. 7, no. 45. John Wiley and Sons Inc, Dec. 06, 2022. doi: 10.1002/slct.202203896.
- [168] M. Molnar *et al.*, "Environmentally friendly approach to knoevenagel condensation of rhodanine in choline chloride: Urea deep eutectic solvent and qsar studies on their antioxidant activity," *Molecules*, vol. 23, no. 8, p. 1DUMMY, 2018, doi: 10.3390/molecules23081897.
- [169] E. B. Ozer, C. Caglayan, and S. Bayindir, "The solvent-controlled regioselective synthesis of 3-amino-5-aryl-rhodanines as novel inhibitors of human carbonic anhydrase enzymes," *Tetrahedron*, vol. 120, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.tet.2022.132896.
- [170] C. L. Fleming, P. A. Sandoz, T. Inghardt, B. Önfelt, M. Grøtli, and J. Andréasson, "A Fluorescent Kinase Inhibitor that Exhibits Diagnostic Changes in Emission upon

- Binding," *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 58, no. 42, pp. 15000–15004, Oct. 2019, doi: 10.1002/anie.201909536.
- [171] E. Lee, S. H. Shim, and M. Cho, "Fluorescence enhancement of a ligand-activated fluorescent protein induced by collective noncovalent interactions," *Chem Sci*, vol. 9, no. 44, pp. 8325–8336, 2018, doi: 10.1039/C8SC03558J.