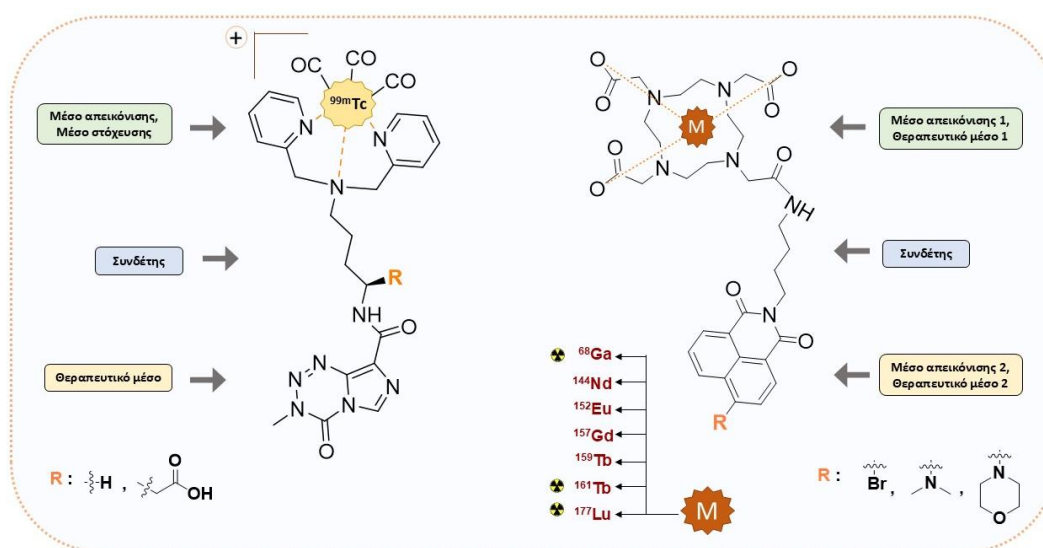


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΡΑΔΙΟΘΕΡΑΠΟΓΝΩΣΤΙΚΩΝ
ΠΛΑΤΦΟΡΜΩΝ ΓΙΑ ΤΟ ΓΛΟΙΩΜΑ».



ΜΠΙΣΤΑΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025

Εισαγωγή στο Π.Μ.Σ. του κ. Μπίστα Βασίλη Παναγιώτη: 23-10-2021

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: Καθηγητής κος Τζάκος Ανδρέας

Θέμα: «Σχεδιασμός, Σύνθεση και Αξιολόγηση Ραδιοθεραπευτικών Πλατφορμών για το Γλοίωμα».

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 18822/12-05-2025

- 1. Τζάκος Ανδρέας, Καθηγητής**
- 2. Αλεξίου Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής**
- 3. Μπουζιώτη Πηνελόπη, Ερευνήτρια Α', ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος"**

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διατριβής στις 29-05-2025 (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.

Πρώτα απ' όλα, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα μου, τον καθηγητή κ. Ανδρέα Τζάκο. Η εμπιστοσύνη που μου έδειξε, η πίστη του στις δυνατότητές μου και η αμέριστη στήριξή του σε κάθε στάδιο της συνεργασίας μας ήταν για μένα πολύτιμα αγαθά. Οι γνώσεις, οι συμβουλές και η ενθάρρυνσή του με βοήθησαν να εξελιχθώ, να αγαπήσω ακόμα περισσότερο την επιστήμη της χημείας και να μάθω να αντιμετωπίζω με ψυχραιμία και κριτική σκέψη κάθε δυσκολία. Η ηθική και υλική υποστήριξη που προσέφερε, μου έδωσε κουράγιο και δύναμη να συνεχίσω την προσπάθειά μου με ενθουσιασμό και προσήλωση. Για όλα αυτά, τον ευχαριστώ από καρδιάς.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω στον κ. Γεώργιο Αλεξίου, αναπληρωτή καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, που δέχθηκε να αποτελεί μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής καθώς και τα μέλη της ομάδας του: Μαρία Γιαννακοπούλου, Βασιλική Ζώη για την διεξαγωγή των πειραμάτων κυτταροτοξικότητας αλλά και για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

Ένα ακόμα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω στην κα. Πηνελόπη Μπουζιώτη, Διευθύντρια Ερευνών στο Ινστιτούτο Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας, του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος» που δέχθηκε να αποτελεί μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής καθώς και τα μέλη της ομάδας της: Αδαμαντία Αποστολοπούλου, Δανάη Bajwa, για την διεξαγωγή των πειραμάτων ραδιοεπισήμανσης, *in vitro* σταθερότητας, *in vivo* βιοκατανομή σε CFW ποντίκια Επιπλέον τους ευχαριστώ και για την υπέροχη συνεργασία και τις γνώσεις που μου μετέδωσαν στο πλαίσιο αυτής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ιωάννη Λεονάρδο, καθηγητή του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, καθώς και τον Μάξιμο Λεονάρδο για τα πειράματα τοξικότητας σε πειραματικά μοντέλα zebrafish.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Κέντρο NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη βοήθειά του στη λήψη των φασμάτων NMR, το Εμπειρικό Ίδρυμα για την αναβάθμιση της οργανολογικής υποδομής φθορισμομετρίας αλλά και το Βιοϊατρικό & Αναλυτικό Κέντρο BAC, και συγκεκριμένα τον Νικόλαο Παρίση, για την λήψη φασμάτων μάζας και την εξαιρετική συνεργασία.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω στην υποψήφια διδάκτορα και καλή μου φίλη Σταυρούλα Κύρκου, για τις γνώσεις που μου έδωσε τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πρακτικό επίπεδο, την αδιάκοπη βοήθεια αλλά και τις χρήσιμες συμβουλές που παρείχε. Επίσης την ευχαριστώ για την λήψη των φασμάτων 2D-NMR και την καθοδήγηση στα πειράματα φθορισμού. Ένα ακόμα μεγάλο ευχαριστώ να δώσω στους συνεργάτες και πάνω από όλα φίλους Ευγενία Φώτου, Χριστίνα Μπίκα, Θωμά Αντωνίου, Ιωάννη Νικούλη, Murugan Chinnarasu, Ειρηναίο Βρέττο, Κατερίνα Δανέλη, Aaqib Ullah, καθώς και όλα τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας που είχα την τύχη και την χαρά να συνεργαστώ όλα αυτά τα χρόνια. Η υποστήριξή τους σε προσωπικό και σε επαγγελματικό επίπεδο αλλά και το υπέροχο κλίμα συνεργασίας που δημιουργούσαν έκαναν την κάθε μέρα μου ξεχωριστή και ευχάριστη. Σας ευχαριστώ για όλες τις όμορφες αναμνήσεις.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω στους αγαπημένους μου ανθρώπους Κωσταντίνα, Γιάννη, Μυρτώ, Κώστα, και Αλέξανδρο. Τους είμαι ευγνώμων για την τεράστια στήριξη που μου παρείχαν και την υπομονή που έδειξαν όλο αυτόν τον καιρό.

Τέλος, ένα πραγματικά τεράστιο ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου το οφείλω στους ανθρώπους που χωρίς αυτούς δεν θα κατάφερνα τίποτα. Αυτό το ευχαριστώ πάει στην οικογένειά μου, τους γονείς μου Λαμπρινή και Γρηγόρη, την αδερφή μου Μαριάννα, την Αφροδίτη, τους θείους μου Ευαγγελία και Παύλο καθώς και όλους τους συγγενείς μου που με στήριξαν στο ταξίδι αυτό. Με μάθατε να πιστεύω στον εαυτό μου και να μην τα παρατάω. Σταθήκατε δίπλα μου από την πρώτη μέρα. Την μεταπτυχιακή μου διατριβή την αφιερώνω σε όλους εσάς.

Την ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής βοήθησε η χρηματοδότηση από στο πλαίσιο του Εθνικού Σχεδίου Ανάκαμψης και Ανθεκτικότητας Ελλάδα 2.0, που χρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση – NextGenerationEU, στο πλαίσιο της πρόσκλησης ΕΡΕΥΝΑ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ (κωδικός έργου: TAEDK-06189/ T2EDK-0326, Ακρωνύμιο: Γλοιοβλάστωμα).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	10
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	11
ABSTRACT	12
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
1.1 Ο καρκίνος	13
1.2 Έναρξη και εξάπλωση του καρκίνου	13
1.3 Τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου	14
1.3.1 Διατήρηση της πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης	14
1.3.2 Απενεργοποίηση των καταστολέων ανάπτυξης	15
1.3.3 Αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο	15
1.3.4 Ενεργοποίηση της αναπαραγωγικής αθανασίας	15
1.3.5 Πρόκληση αγγειογένεσης	16
1.3.6 Ενεργοποίηση εισβολής και μετάστασης	16
1.3.7 Αστάθεια γονιδιώματος και μετάλλαξη	16
1.3.8 Φλεγμονή που προάγει τον όγκο	16
1.3.9 Επαναπρογραμματισμός ενεργειακού μεταβολισμού	17
1.3.10 Αποφυγή της ανοσολογικής καταστροφής	17
1.3.11 Ενεργοποίηση της φαινοτυπικής πλαστικότητας	17
1.3.12 Μη μεταλλαγμένος επιγενετικός επαναπρογραμματισμός	17
1.3.13 Πολυμορφικά μικροβιώματα	18
1.3.14 Γηρασμένα κύτταρα	18
1.4 Το μικροπεριβάλλον του καρκινικού όγκου	19
1.4.1 Συνθήκες υποξίας	20
1.4.2 Περιβάλλον χαμηλού pH	20
1.4.3 Υψηλό ιξώδες	20
1.4.4 Το φαινόμενο Warburg	21
1.5 Τύποι καρκίνου και κατηγοριοποίησή τους	21
1.6 Στατιστικά που αφορούν τον καρκίνο	23
1.7 Διάγνωση του καρκίνου	24
1.7.1 Εργαστηριακές εξετάσεις	24
1.7.2 Βιοψία	24
1.7.3 Μέθοδοι απεικόνισης	25
1.7.3.1 Η αξονική τομογραφία (Computed Tomography, CT Scan)	25
1.7.3.2 Μαγνητική τομογραφία (Magnetic Resonance Imaging, MRI)	25
1.7.3.3 Πυρηνική σάρωση (Nuclear Scan)	25

1.7.3.4 Σάρωση οστών (Bone Scan)	25
1.7.3.5 Τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (Positron Emission Tomography, PET Scan)	25
1.7.3.6 Μονοφωτονιακή τομογραφία εκπομπής (Single photon emission computed tomography, SPECT).....	26
1.7.3.7 Υπέρηχος (Ultrasound, US)	26
1.7.3.8 Ακτινογραφίες (X-rays)	26
1.7.4 Οπτική απεικόνιση μέσω φθορισμού - φωσφορισμού.....	26
1.7.4.1 Φασματομετρία UV-Vis / Φασματομετρία Φθορισμού	26
1.7.4.2 Φωτοεπαγόμενη Μεταφορά Ηλεκτρονίων, PET	27
1.7.4.3 Ενδομοριακή Μεταφορά Φορτίου, ICT.....	28
1.7.4.4 Μεταφορά ενέργειας μέσω συντονισμού Förster, FRET.....	29
1.7.4.5 Μεταφορά ενέργειας Dexter, DET	29
1.8 Τύποι θεραπείας κατά του καρκίνου	29
1.8.1 Χημειοθεραπεία	30
1.8.2 Ορμονοθεραπεία.....	30
1.8.3 Υπερθερμία.....	30
1.8.4 Ανοσοθεραπεία	30
1.8.5 Φωτοδυναμική Θεραπεία.....	30
1.8.6 Ακτινοθεραπεία.....	30
1.8.7 Μεταμόσχευση Βλαστοκυττάρων Αίματος.....	30
1.8.8 Χειρουργική αφαίρεση του καρκίνου	30
1.8.9 Στοχευμένη Θεραπεία	31
1.8.10 Θεραπεία με συζεύγματα φαρμάκου - μορίου στόχευσης.....	32
1.9 Ραδιοφάρμακα και ραδιοθεραπογνωστικά στον καρκίνο	34
1.9.1 Τι είναι τα ραδιοφάρμακα και τα ραδιοθεραπογνωστικά;	34
1.9.2 Τα ραδιοϊσότοπα μετάλλων στην διάγνωση και θεραπεία	35
1.9.3 Θεραπεία με ηλεκτρόνια Auger.....	37
1.9.4 Θεραπεία με σωματίδια α	37
1.9.5 Θεραπεία με σωματίδια β	38
1.10 Το γλοίωμα: οι μορφές του, η διάγνωση και η θεραπεία.....	38
1.10.1 Το γλοίωμα	38
1.10.2 Διάγνωση και θεραπεία.....	41
1.10.3 Ο ρόλος της Τεμοζολομίδης	43
1.11 Χηλικοί υποκαταστάτες	43
1.11.1 Μη-κυκλικοί χηλικοί υποκαταστάτες.....	44

1.11.2 Κυκλικοί χηλικοί υποκαταστάτες	44
1.12 Τα 1,8-ναφθαλιμίδια στον καρκίνο.....	45
1.12.1 Αντιδράσεις πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης	46
1.12.2 Αντιδράσεις διασταυρούμενης σύζευξης.....	47
1.12.3 Αντίδραση σχηματισμού ιμιδίου	48
1.13 Σκοπός.....	49
II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	50
2.1 Υλικά και μέθοδοι	50
2.2 Λογικός σχεδιασμός των ενώσεων.....	51
2.3.1 Σύνθεση της Ένωσης 1	54
2.3.2 Χαρακτηρισμός της ένωσης 1	55
2.4.1 Σύνθεση της Ένωσης 2	56
2.4.2 Χαρακτηρισμός της ένωσης 2	57
2.5.1 Σύνθεση της Ένωσης 3β.....	59
2.5.2 Χαρακτηρισμός της ένωσης 3β	60
2.6.1 Σύνθεση της Ένωσης 3γ	61
2.6.2 Χαρακτηρισμός της ένωσης 3γ	62
2.7 Σύνθεση των Ενώσεων 4	63
2.7.1 Σύνθεση της Ένωσης 4α	63
2.7.2 Χαρακτηρισμός της Ένωσης 4α.....	64
2.7.3 Σύνθεση της Ένωσης 4β.....	65
2.7.4 Χαρακτηρισμός της Ένωσης 4β.....	66
2.7.5 Σύνθεση της Ένωσης 4γ	67
2.7.6 Χαρακτηρισμός της Ένωσης 4γ	68
2.8 Σύνθεση των Ενώσεων 5	69
2.8.1 Σύνθεση της Ένωσης 5α	69
2.8.2 Χαρακτηρισμός της Ένωσης 4α.....	70
2.8.3 Σύνθεση της Ένωσης 5β.....	71
2.8.4 Χαρακτηρισμός της Ένωσης 5β.....	72
2.8.5 Σύνθεση της Ένωσης 5γ	73
2.8.6 Χαρακτηρισμός της Ένωσης 5γ	73
2.9 Σύνθεση των Ενώσεων 6	75
2.9.1 Σύνθεση της Ένωσης 6α	76
2.9.2 Σύνθεση της Ένωσης 6β.....	77
2.9.3 Σύνθεση της Ένωσης 6γ	78
2.10 Σύνθεση των Ενώσεων 7	80

2.10.1	Σύνθεση της Ένωσης 7α	80
2.10.2	Χαρακτηρισμός της Ένωσης 7α.....	81
2.10.3	Σύνθεση της Ένωσης 7β.....	85
2.10.4	Χαρακτηρισμός της Ένωσης 7β.....	86
2.9.5	Σύνθεση της Ένωσης 7γ.....	89
2.10.6	Χαρακτηρισμός της Ένωσης 7γ.....	90
2.11.1	Σύνθεση της Ένωσης 8.....	92
2.11.2	Χαρακτηρισμός της ένωσης 8	94
2.12.1	Σύνθεση της Ένωσης 9.....	95
2.12.2	Χαρακτηρισμός της ένωσης 9	95
2.13.1	Σύνθεση της Ένωσης 10.....	96
2.13.2	Χαρακτηρισμός της ένωσης 10	97
2.14.1	Σύνθεση της ένωσης 11	100
2.14.2	Χαρακτηρισμός της ένωσης 11.	101
2.15.1	Σύνθεση της ένωσης 12	102
2.15.2	Χαρακτηρισμός της ένωσης 12	103
2.16.1	Σύνθεση της ένωσης 13	104
2.16.2	Χαρακτηρισμός της ένωσης 13	106
2.16.1	Σύνθεση της ένωσης 14	106
2.16.2	Χαρακτηρισμός της ένωσης 14	107
III.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	110
3.1	Μελέτη φασματοσκοπικών ιδιοτήτων.....	110
3.2	Πειράματα επισήμανσης με ψυχρά μέταλλα	116
3.3	Πειράματα κυτταροτοξικότητας.....	121
3.4	Πειράματα ραδιοεπισήμανσης και <i>in vitro</i> σταθερότητας	124
3.4.1	Ραδιοεπισήμανση των ενώσεων 7α, 7β, 7γ με Γάλλιο-68 (⁶⁸ Ga)	124
3.4.2	Μελέτες <i>in vitro</i> σταθερότητας των ενώσεων 7α, 7β, 7γ με Γάλλιο-68 (⁶⁸ Ga)	125
3.4.3	Ραδιοεπισήμανση της ένωσης 7α με Τέρβιο-161 (¹⁶¹ Tb) και Λουτέσιο-177 (¹⁷⁷ Lu)	126
3.4.4	Μελέτες <i>in vitro</i> σταθερότητας της 7α με Τέρβιο-161 (¹⁶¹ Tb) και Λουτέσιο-177 (¹⁷⁷ Lu)	126
3.4.5	Ραδιοεπισήμανση της ένωσης 10 με Τεχνητίο-99m (^{99m} Tc).....	127
3.4.6	Μελέτες <i>in vitro</i> σταθερότητας τη ένωσης 10 με Τεχνητίο-99m (^{99m} Tc)	128
3.5	Πειράματα <i>in vivo</i> βιοκατανομής.....	129
3.5.1	Αποτελέσματα [¹⁶¹ Tb]Tb-7α	129

3.5.2 Αποτελέσματα [^{99m} Tc]Tc-10.....	130
IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	132
V. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	134
VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	135

ΣΥΝΤΗΜΗΣΕΙΣ

H ₂ O : Απιονισμένο νερό	rt : Θερμοκρασία δωματίου
CH ₂ Cl ₂ : Διχλωρομεθάνιο	Reflux : Αναβρασμός διαλύτη
MeOH : Μεθανόλη	TLC : Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας
EtOH : Αιθανόλη	Uv-Vis : Υπεριώδες-Ορατό
C ₆ H ₁₄ : Εξάνιο	R _f : Συντελεστής επιβράδυνσης
MeCN : Ακετονιτρίλιο	Flash χρωματογραφία : Χρωματογραφία στήλης υπό πίεση
DMF : Διμεθυλοφορμαμίδιο	ESI-MS : Φασματομετρία μάζας με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού
DMA : Διμεθυλοακεταμίδιο	HPLC : Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
Dioxane : Διοξάνιο	NMR : Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
TFA : Τριφθοροξικό οξύ	¹ H-NMR : Φάσμα NMR πρωτονίου
FA : Φορμικό οξύ	¹³ C-NMR : Φάσμα NMR άνθρακα
C ₂ H ₄ Cl ₂ : 1,2-διχλωροεθάνιο	2D-NMR : Φάσμα NMR δύο διαστάσεων
DIPEA : N,N-δισοπροπυλαιθυλαμίνη	HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation Πείραμα NMR
TEA : Τριαιθυλαμίνη	HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence Πείραμα NMR
Na(OAc) ₃ BH : Τριακετοξυβοροϋδρίδιο του νατρίου	R : οργανική ένωση
CDCl ₃ : Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο	D : Δότης σε θεμελιώδη κατάσταση
DMSO-d ₆ : Δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο	D* : Δότης σε διεγερμένη κατάσταση
NaOAc : Οξικό νάτριο	A : Δέκτης σε θεμελιώδη κατάσταση
K ₂ CO ₃ : Ανθρακικό κάλιο	A* : Δέκτης σε διεγερμένη κατάσταση
Na ₂ SO ₄ : Θεικό νάτριο	λ _{max} : Μέγιστη τιμή μήκους κύματος απορρόφησης
CuSO ₄ *5H ₂ O : Πενταένυδρος θειικός χαλκός	λ _{exc} : Μέγιστη τιμή μήκους κύματος διέγερσης
NaOH : Υδροξείδιο του νατρίου	λ _{em} : Μέγιστη τιμή μήκους κύματος ακπομπής
Silica Gel : Πυριτική γέλη	Stokes shift : Μετατόπιση Stokes
<i>In situ</i> : επί τόπου	ExcScan : Φάσμα διέγερσης
<i>In vivo</i> : Πείραμα σε ζωντανό οργανισμό	EmScan : Φάσμα εκπομπής
<i>In vitro</i> : Πείραμα σε κύτταρα	TMZ-COOH : 3-Μεθυλ-4-οξο-3,4-διυδροϊμιδαζο[5,1-d][1,2,3,5]τετραζινο-8-καρβοξυλικό οξύ
DNA : δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ	Dry διαλύτης : Άνυδρος διαλύτης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες θνησιμότητας παγκοσμίως. Το γλοίωμα είναι κακοήθης όγκος του κεντρικού νευρικού συστήματος που προέρχεται από τα νευρογλοιακά κύτταρα και χαρακτηρίζεται για την επιθετικότητα και την ανθεκτικότητά του ως προς τις θεραπείες. Η πιο συχνή και επιθετική μορφή είναι το γλοιοβλάστωμα (Glioblastoma, GBM). Η διάγνωση και θεραπεία του γλοιώματος παραμένει μια πρόκληση με την ερευνητική κοινότητα να εστιάζει τα τελευταία χρόνια στην χρήση θεραπογνωστικών, δηλαδή ενώσεων με ταυτόχρονη διάγνωση και θεραπεία.

Στην παρούσα εργασία, έγινε σχεδιασμός, σύνθεση και αξιολόγηση δυο ραδιοθεραπευτικών πλατφορμών, ενώσεων που προσφέρουν διάγνωση και θεραπεία ταυτόχρονα. Η πρώτη σχεδιάστηκε για απεικόνιση μέσω φθορισμού αλλά και θεραπεία λόγω της κυτταροτοξικότητας του χρωμοφόρου, που είναι ένα ανάλογο του 1,8-ναφθαλιμιδίου, το οποίο παρεμβάλλεται στις αζωτούχες βάσεις του DNA. Το μόριο DOTA χρησιμοποιήθηκε ως χηλικός υποκαταστάτης για την δέσμευση ψυχρών μετάλλων όπως ^{144}Nd , ^{157}Gd , ^{152}Eu , ^{159}Tb αλλά και ραδιοϊσοτόπων όπως ^{177}Lu , ^{161}Tb , ^{68}Ga για απεικόνιση με MRI, PET και SPECT. Στην συνέχεια, η χρωστική τροποποιήθηκε με σκοπό την στόχευση του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος (λυσοσώματα, σημαντικά οργάνια των καρκινικών κυττάρων). Οι τρεις ενώσεις μελετήθηκαν ως προς τις φωτοφυσικές τους ιδιότητες, πραγματοποιήθηκαν επισημάνσεις με μη-ραδιενεργά μέταλλα αλλά και μελέτες για την κυτταροτοξική δράση των αναλόγων του 1,8-ναφθαλιμιδίου σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος. Τα τρία θεραπογνωστικά επισημάνθηκαν επίσης με ραδιομέταλλα, όπου έγιναν μελέτες *in vitro* σταθερότητας και *in vivo* βιοκατανομής σε Carworth Farms Webster (CFW) ποντίκια.

Η δεύτερη πλατφόρμα σχεδιάστηκε και συντέθηκε με στόχο τη διάγνωση μέσω απεικόνισης SPECT με $^{99\text{m}}\text{Tc}$ και στόχευση των μιτοχονδρίων (οργάνια που υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα). Ο χηλικός υποκαταστάτης συνδέθηκε μέσω κατάλληλου αλειφατικού συνδέσμου με ένα μόριο Τεμοζολομίδης, κυτταροτοξικός παράγοντας που χρησιμοποιείται στην χημειοθεραπεία του γλοιώματος. Ακολούθησαν μελέτες κυτταροτοξικότητας σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος, πειράματα τοξικότητας σε πειραματικά μοντέλα zebrafish καθώς και επισημάνση με το ραδιομέταλλο. Ακολούθησαν μελέτες της *in vitro* σταθερότητας και *in vivo* βιοκατανομής σε CFW ποντίκια. Στην συνέχεια συντέθηκε ανάλογο της εν λόγω πλατφόρμας με διττό στόχο: (α) να μπορεί να προσδεθεί σε πεπτιδικούς φορείς για να επιτευχθεί αύξηση της στόχευσης του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος και αύξηση της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και (β) να δύναται να αξιοποιηθεί ως τροποποιημένο αμινοξύ για τη σύνθεση πεπτιδικών φορέων σε στερεά φάση που να μπορούν εύκολα να επισημανθούν με ραδιομέταλλα και να επιτελείται απεικόνιση SPECT του γλοιώματος.

ABSTRACT

Cancer remains one of the leading causes of mortality worldwide. Glioma is a malignant tumor of the central nervous system originating from glial cells and is characterized by its aggressiveness and resistance to treatment. The most common and aggressive form is glioblastoma (GBM). Diagnosis and treatment of glioma continue to pose significant challenges, with recent research efforts focusing on theranostic compounds that combine diagnostic and therapeutic capabilities.

In the present study, the design, synthesis, and evaluation of two radiotheranostic platforms were conducted. These compounds enable both diagnosis and therapy due to their ability to chelate radiometals. The first platform was developed for fluorescence imaging and therapeutic action through the cytotoxicity of the chromophore, an analogue of 1,8-naphthalimide, which intercalates into DNA nitrogenous bases. DOTA was used as a chelating agent to bind both stable metals (e.g., ^{144}Nd , ^{157}Gd , ^{152}Eu , +Tb) and radionuclides (e.g., ^{177}Lu , ^{161}Tb , ^{68}Ga) for MRI, PET, and SPECT imaging. Subsequently, the chromophore was modified to enable lysosomal targeting, as lysosomes play a significant role in cancer cell survival.

The three compounds were evaluated for their photophysical properties, labeled with non-radioactive metals, and evaluated for cytotoxic activity of the 1,8-naphthalimide analogues on glioma cell lines. Radiolabeling with radiometals was also performed, followed by *in vitro* stability studies and *in vivo* biodistribution in Carworth Farms Webster (CFW) mice.

The second platform was designed for diagnosis via SPECT imaging with the radiometal $^{99\text{m}}\text{Tc}$ targeting mitochondria (organelles overexpressed in cancer cells) due to the positive charge of the formed complex. The chelator is connected with an aliphatic linker to Temozolomide, a drug primarily used in glioma chemotherapy. This was followed by cytotoxicity studies in glioma cell lines, toxicity experiments in zebrafish, and radiolabeling with $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Subsequent studies were performed on *in vitro* stability and *in vivo* biodistribution in CFW mice. Additionally, an analogue was synthesized with a dual purpose: (a) to be able to bind to peptide carriers to achieve increased targeting of the cancer microenvironment and increased blood-brain barrier permeability, and (b) to be capable of being utilized as a modified amino acid for the synthesis of peptide carriers in solid phase that can be easily labeled with radiometals for SPECT imaging of gliomas.

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο καρκίνος

Ο ανθρώπινος οργανισμός αποτελείται από τρισεκατομμύρια κύτταρα τα οποία πολλαπλασιάζονται μέσω της διαδικασίας της κυτταρικής διαίρεσης. Κάποιες φορές όμως η διαδικασία αυτή εμφανίζει σφάλματα και μη φυσιολογικά κύτταρα συνεχίζουν να αναπτύσσονται. Η ασθένεια αυτή, όπου τα κύτταρα του σώματος πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα ονομάζεται καρκίνος αλλιώς και νεοπλασματική νόσος. Από ένα σημείο και μετά αρχίζουν και σχηματίζονται μικρού μεγέθους μάζες, οι λεγόμενοι όγκοι. Αυτές μπορεί να είναι καλοήθεις (δεν αποτελούν συνήθως σοβαρό κίνδυνο για τον οργανισμό με εξαίρεση όταν είναι πολύ μεγάλοι σε μέγεθος ή σε επικίνδυνη περιοχή όπως ο εγκέφαλος) ή καρκινικοί (αλλιώς και κακοήθεις). Μία από τις ιδιότητες των καρκινικών όγκων είναι ότι επιτίθενται σε κοντινούς ιστούς με αποτέλεσμα να εξαπλώνονται και στο υπόλοιπο σώμα. Επίσης, οι κακοήθεις όγκοι μετά την αφαίρεση τους έχουν μεγάλη πιθανότητα να αναπτυχθούν ξανά σε αντίθεση με τους καλοήθεις ¹.

Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται από μονά τους και να αγνοούν σήματα που θα τα οδηγήσουν σε απόπτωση. Μπορούν να δημιουργήσουν νέα αιμοφόρα αγγεία για καλύτερη τροφοδότηση του όγκου με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά και να καμουφλαριστούν από το ανοσοποιητικό σύστημα για να επιβιώσουν. Επιπλέον οι πηγές ενέργειας των καρκινικών κυττάρων αλλά και οι τρόποι παραγωγής της διαφέρουν από αυτά των φυσιολογικών ¹.

1.2 Έναρξη και εξάπλωση του καρκίνου

Ο καρκίνος είναι γενετική ασθένεια και μπορεί να προκληθεί από αλλαγές στα γονίδια, δηλαδή από σφάλματα κατά την κυτταρική διαίρεση, βλάβες στο γενετικό υλικό (DNA) ακόμα και από αλλαγές που κληρονομεί ένα άτομο από τους γονείς του. Οι αλλαγές αυτές επηρεάζουν τρεις τύπους γονιδίων: τα πρωτοογκογονίδια, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια και τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA (Πίνακας 1) ¹.

Πίνακας 1: Τύποι γονιδίων που επηρεάζει ο καρκίνος.

Κατηγορία γονιδίων	Ρόλος	Συνέπειες αλλαγών
Πρωτοογκογονίδια	Ελέγχουν τη φυσιολογική ανάπτυξη και διαίρεση των κυττάρων.	Μετατρέπονται σε ογκογονίδια επιτρέποντας την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των κυττάρων.
Ογκοκατασταλτικά γονίδια	Ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση, αποτρέποντας τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων.	Ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των κυττάρων.

Γονίδια επιδιόρθωσης DNA	Επιδιορθώνουν τις βλάβες που προκαλούνται στο DNA από περιβαλλοντικούς ή ενδογενείς παράγοντες.	Ελαττωματική επιδιόρθωση με αποτέλεσμα εμφάνιση και άλλων μεταλλάξεων και καρκινογένεση.
--------------------------	---	--

Ο καρκίνος μετά την πρωταρχική του ανάπτυξη μπορεί να -εξαπλωθεί και σε άλλα σημεία του οργανισμού. Αυτός ο τύπος καρκίνου ονομάζεται μεταστατικός καρκίνος και η διαδικασία εξάπλωσης των καρκινικών κυττάρων μετάσταση. Τα μεταστατικά κύτταρα δεν διαφέρουν από τα αρχικά καρκινικά που προήλθαν και έχουν κοινά χαρακτηριστικά. Οι μεταστατικοί όγκοι προκαλούν περισσότερες βλάβες στον τρόπο λειτουργίας του οργανισμού και για αυτό αποτελούν την κύρια αιτία θανάτου ¹.

1.3 Τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου

Τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου είναι βασικές βιολογικές ικανότητες που επιτρέπουν την ανάπτυξη και εξέλιξη των όγκων. Αρχικά το 2000 από τους Douglas Hanahan και Robert A. Weinberg περιεγράφηκαν τα πρώτα έξι χαρακτηριστικά γνωρίσματα ενώ στην συνέχεια, το 2011 ενημερώθηκαν δύο γνωρίσματα και δύο χαρακτηριστικά ενεργοποίησης. Επιπλέον, το 2022 ο Hanahan πρόσθεσε άλλα τέσσερα. Τα γνωρίσματα αυτά αποτελούν θεμέλιο στην πληρέστερη κατανόηση της πολυπλοκότητας, των μηχανισμών και της εκδήλωσης της νόσου (Πίνακας 2) ^{2,3}.

Πίνακας 2: Τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου από τους Hanahan και Weinberg ^{2,3}.

Έτος	Χαρακτηριστικό γνώρισμα
2000	• Διατήρηση της πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης • Αποφυγή των καταστολέων ανάπτυξης • Αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο • Ενεργοποίηση της αναπαραγωγικής αθανασίας • Πρόκληση αγγειογένεσης • Ενεργοποίηση εισβολής και μετάστασης
2011	• Αστάθεια γονιδιώματος και μετάλλαξη • Φλεγμονή που προάγει τον όγκο • Επαναπρογραμματισμός ενεργειακού μεταβολισμού • Αποφυγή της ανοσολογικής καταστροφής
2022	• Ενεργοποίηση της φαινοτυπικής πλαστικότητας • Μη μεταλλαγμένος επιγενετικός επαναπρογραμματισμός • Πολυμορφικά μικροβιώματα • Γηρασμένα κύτταρα

1.3.1 Διατήρηση της πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης

Στα φυσιολογικά κύτταρα υπάρχει αυστηρός έλεγχος στην παραγωγή και απελευθέρωση σημάτων που προάγουν την ανάπτυξη που οδηγούν στην είσοδο και πρόοδο

μέσω του κύκλου κυτταρικής ανάπτυξης-διαίρεσης. Αποτέλεσμα αυτού είναι η διατήρηση του αριθμού των κυττάρων και της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής/λειτουργίας αυτών. Τα σήματα ενεργοποίησης μεταφέρονται κυρίως από αυξητικούς παράγοντες που δεσμεύονται σε υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη, ακολουθούμενα από ενεργοποίηση ενδοκυττάρων οδών σηματοδότησης που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα καρκινικά κύτταρα απορυθμίζουν αυτά τα σήματα αποκτώντας τον έλεγχο, με αποτέλεσμα να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα παρουσία ή απουσία αυξητικών παραγόντων ².

1.3.2 Απενεργοποίηση των καταστολέων ανάπτυξης

Μετά την δέσμευση των σημάτων ανάπτυξης, ακολουθεί παραγωγή σημάτων που καθυστερούν την κυτταρική διαίρεση προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση των ιστών. Η παύση της ανάπτυξης εξαρτάται από δράσεις των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Στα καρκινικά κύτταρα λόγω μεταλλάξεων τα γονίδια αυτά απενεργοποιούνται και τα κύτταρα αγνοούν τα εξωτερικά σήματα και συνεχίζουν να αναπτύσσονται ².

1.3.3 Αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι ο θάνατος του κυττάρου μέσω ενός ενδοκυτταρικού μηχανισμού. Ο μη αντιστρέψιμος κυτταρικός θάνατος ονομάζεται απόπτωση και κατέχει κρίσιμο ρόλο στην δημιουργία όγκων. Η απόπτωση περιλαμβάνει μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές στα κύτταρα και ρυθμίζεται από την ισορροπία μεταξύ προ-αποπτωτικών (όπως τα Λεμφώματα B-κυττάρων 2, B-cell lymphoma 2, Bcl-2) και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών (όπως οι ρυθμιστές απόπτωσης Bax και Bak). Οι προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες μπορούν να υποστούν αλλαγές μετά τη δημιουργία τους, οι οποίες τις ενεργοποιούν και τις κατευθύνουν προς τα μιτοχόνδρια, όπου ξεκινά η διαδικασία του κυτταρικού θανάτου. Μόλις αποδεσμευτούν από τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, διαταράσσουν τη δομή της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Αυτό οδηγεί στην απελευθέρωση πρωτεϊνών που σηματοδοτούν την απόπτωση, με πιο σημαντική από αυτές το κυτόχρωμα c. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν διάφορους τρόπους να αποφεύγουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η απενεργοποίηση του γονιδίου p53 (Πρωτεΐνη όγκου p53, Tumor protein p53), το οποίο ελέγχει για βλάβες στο DNA. Επιπλέον, μπορούν να αυξάνουν την παραγωγή αντι-αποπτωτικών ή να μειώνουν την παραγωγή προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών ².

1.3.4 Ενεργοποίηση της αναπαραγωγικής αθανασίας

Στα φυσιολογικά κύτταρα με το πέρασμα του χρόνου προάγεται η σμίκρυνση των άκρων των χρωμοσωμάτων, των τελομερών (επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA οι οποίες δεν περιέχουν γενετικά χρήσιμες πληροφορίες) μέχρι την στιγμή που θα ενεργοποιηθεί ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Η DNA πολυμεράση δεν μπορεί να αντιγράψει όλες της αζωτούχες βάσεις των τελομερών κατά τον διπλασιασμό με αποτέλεσμα να χάνεται η ικανότητα πολλαπλασιασμού. Παρόλο που αυτό αντιμετωπίζεται από το ένζυμο τελομεράση, τα φυσιολογικά κύτταρα διαιρούνται μέχρι ένα περιορισμένο αριθμό διαιρέσεων, προσδίδοντάς τους περιορισμένο χρόνο ζωής. Στα καρκινικά κύτταρα ωστόσο, η τελομεράση υπερλειτουργεί προσθέτοντας παραπάνω νουκλεοτίδια οδηγώντας τα σε κυτταρική διαίρεση για υπερβολικά χρονικά διαστήματα ².

1.3.5 Πρόκληση αγγειογένεσης

Μία από τις ομοιότητες των καρκινικών και των φυσιολογικών κυττάρων είναι η ανάγκη για λήψη θρεπτικών συστατικών, οξυγόνου καθώς και η αποβολή ανεπιθύμητων ουσιών/μεταβολιτών. Η ανάγκη αυτή καλύπτεται με την δημιουργία νέων ενδοθηλιακών κυττάρων και τον σχηματισμό αγγείων, διαδικασία που ονομάζεται αγγειογένεση. Στους φυσιολογικούς οργανισμούς η διαδικασία αυτή ενεργοποιείται προσωρινά όταν για παράδειγμα γίνεται επούλωση πληγών ή ανάπτυξη μυών, ενώ στους καρκινικούς όγκους μένει πάντα ενεργή, δίνοντας στον όγκο παραπάνω τροφή που συνεπάγεται ταχύτερη ανάπτυξη. Οι κύριοι παράγοντες που προάγουν την αγγειογένεση είναι οι αυξητικοί παράγοντες ινοβλαστών (basic Fibroblast Growth Factor, bFGF) και ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας A (Vascular Endothelial Growth Factor A, VEGF-A). Αν και τα προηγούμενα χρόνια η αγγειογένεση συνδεόταν με τους ήδη ανεπτυγμένους όγκους, νέα δεδομένα δείχνουν ότι είναι θεμελιώδες χαρακτηριστικό του καρκίνου γιατί συμβάλλει και στα αρχικά στάδια ανάπτυξής του ².

1.3.6 Ενεργοποίηση εισβολής και μετάστασης

Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να φεύγουν από την πρωτοπαθή περιοχή λόγω μηχανικών δυνάμεων που τους ασκούνται από γειτονικά κύτταρα ή την εξωκυτταρική μήτρα με αποτέλεσμα να εξαπλώνονται με διήθηση, δηλαδή απευθείας διείσδυση σε γειτονικό ιστό και μετάσταση, μία διαδικασία όπου τα καρκινικά κύτταρα εισβάλουν στα κοντινά αιμοφόρα αγγεία και μεταφέρονται σε απομακρυσμένους ιστούς. Μετά την διαφυγή τους στον νέο ιστό αρχίζουν και μετατρέπονται σε μακροσκοπικούς όγκους, εφόσον οι συνθήκες στο μικροπεριβάλλον είναι κατάλληλες, μια διαδικασία που ονομάζεται αποικισμός. Σε περίπτωση που δεν είναι κατάλληλες οι συνθήκες, τα κύτταρα αυτά έχουν αναπτύξει μηχανισμούς προσαρμογής για να επιβιώσουν. Ένα ενδεικτικό παράδειγμα είναι η μείωση του μεγέθους τους και η είσοδός τους σε μια κατάσταση αναστρέψιμης αδράνειας, μέχρι οι συνθήκες να είναι και πάλι ιδανικές ².

1.3.7 Αστάθεια γονιδιώματος και μετάλλαξη

Βασικός πυλώνας στην εμφάνιση του καρκίνου είναι η αστάθεια γονιδιώματος που οδηγεί σε δημιουργία μεταλλάξεων. Αφού έχει επηρεαστεί η διαδικασία της απόπτωσης στα φυσιολογικά κύτταρα, η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων που συμβάλλουν στον μετασχηματισμό των υγιών κυττάρων σε καρκινικά και κατ' επέκταση στον σχηματισμό του όγκου. Πολλές από τις γνωστές μορφές καρκίνου σχετίζονται με την αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης μεταλλάξεων λόγω της αστάθειας αυτής ².

1.3.8 Φλεγμονή που προάγει τον όγκο

Η φλεγμονή διαδραματίζει διττό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου. Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος διεισδύουν στους όγκους ως μια προσπάθεια αντιμετώπισής τους, με αποτέλεσμα την δημιουργία φλεγμονής στους μη νεοπλασματικούς ιστούς. Παράλληλα όμως μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη του όγκου παρέχοντας αυξητικούς παράγοντες και παράγοντες που προάγουν την δημιουργία του. Επίσης τα κύτταρα της φλεγμονής μπορούν να απελευθερώσουν μεταλλαξιογόνους παράγοντες, όπως οι δραστικές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), που προάγουν τον μετασχηματισμό των

κυττάρων από φυσιολογικά σε καρκινικά. Η φλεγμονή θεωρείται ένα χαρακτηριστικό που επιτρέπει την απόκτηση βασικών ικανοτήτων του καρκίνου ².

1.3.9 Επαναπρογραμματισμός ενεργειακού μεταβολισμού

Ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων, προκειμένου να καλυφθούν οι ανάγκες τους, οδηγεί σε μεταβολές του ενεργειακού μεταβολισμού. Τα φυσιολογικά κύτταρα παράγουν ενέργεια είτε αερόβια μέσω γλυκόλυσης και οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είτε αναερόβια μέσω της αναερόβιας γλυκόλυσης. Τα καρκινικά κύτταρα ωστόσο, ακόμη και με παρουσία οξυγόνου προσαρμόζουν τον μεταβολισμό τους ώστε να βασίζονται κυρίως στην αναερόβια γλυκόλυση, μια κατάσταση γνωστή ως φαινόμενο Warburg. Η αναερόβια γλυκόλυση, ενεργειακά είναι λιγότερο αποδοτική, αλλά σαν διαδικασία μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή ενέργειας με ταχύτερο τρόπο καλύπτοντας άμεσα τις ανάγκες των ταχέως αναπτυσσόμενων καρκινικών κυττάρων. Ταυτόχρονα, μεταγραφικοί παράγοντες όπως οι HIF1a και HIF2a ρυθμίζουν τα ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκόλυσης σε οδούς που με την σειρά τους παρέχουν τα απαραίτητα στοιχεία για την δημιουργία νέων καρκινικών κυττάρων ².

1.3.10 Αποφυγή της ανοσολογικής καταστροφής

Το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού μας βρίσκεται σε μόνιμη λειτουργία. Το ανοσοποιητικό μπορεί να αντιμετωπίσει τα καρκινικά κύτταρα σε πρώιμο στάδιο. Κατά την εξέλιξη του ο καρκίνος καταφέρνει να αναπτύσσει μηχανισμούς ανοσολογικής αποφυγής (όπως η αναστολή της απόπτωσης, η εξάντληση των αμινοξέων αργινίνης και τρυπτοφάνης, η απενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων) και εξαπλώνεται ανεξέλεγκτα. Έτσι, η αποφυγή της ανοσολογικής καταστροφής είναι σημαντικό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων ².

1.3.11 Ενεργοποίηση της φαινοτυπικής πλαστικότητας

Κατά τη διαδικασία σχηματισμού των οργάνων, τα κύτταρα αναπτύσσονται, εξειδικεύονται και οργανώνονται σε ιστούς με σκοπό να αναλάβουν νέες λειτουργίες. Κατά τη διαδικασία αυτή τα κύτταρα διαφοροποιούνται και τα προγονικά κύτταρα σταματούν να αναπτύσσονται. Έτσι η κυτταρική διαφοροποίηση αναστέλλει τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, δημιουργώντας ένα φυσικό εμπόδιο στην ανάπτυξη καρκινικών όγκων. Ωστόσο, η διατήρηση της φαινοτυπικής πλαστικότητας μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη καρκίνου, επιτρέποντας στα κύτταρα είτε να παραμείνουν σε μια ατελώς διαφοροποιημένη κατάσταση είτε να αλλάξουν πορεία, δηλαδή να μεταπηδήσουν σε ένα εντελώς διαφορετικό πρόγραμμα ανάπτυξης, αποκτώντας νέα χαρακτηριστικά διαφορετικού ιστού ³.

1.3.12 Μη μεταλλαγμένος επιγενετικός επαναπρογραμματισμός

Βασικός πυλώνας στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου είναι η αστάθεια και μετάλλαξη του γονιδιώματος. Είναι γνωστό πως διαφορετικοί τύποι καρκίνου αναπτύσσονται λόγω ποικίλων μεταλλάξεων, οι οποίες επηρεάζουν διαφορετικά στάδια της εξέλιξης του και την ανάπτυξη αντιστάσεων στην θεραπεία. Παράλληλα, υπάρχει και ο μη μεταλλαγμένος επιγενετικός επαναπρογραμματισμός, ένας εναλλακτικός μηχανισμός επαναπρογραμματισμού του γονιδιώματος, ανεξάρτητος από μεταλλάξεις, ο οποίος βασίζεται σε επιγενετικές τροποποιήσεις που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων. Αυτές

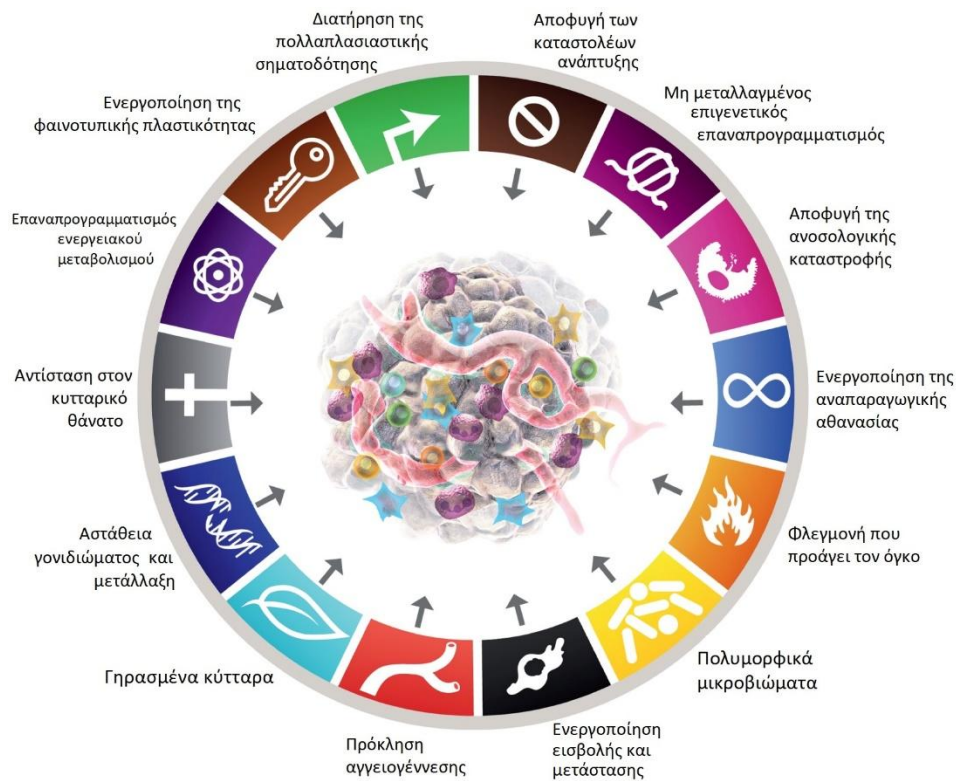
οι αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση χωρίς γενετικές μεταλλάξεις γίνονται μέσω μηχανισμών όπως η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις ιστονών και το Μη-κωδικοποιητικό RNA. Αυτές οι επιγενετικές αλλαγές μπορούν να οδηγήσουν στην απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, την ενεργοποίηση ογκογονιδίων, την αντίσταση στη θεραπεία και τη δημιουργία επιγενετικής ετερογένειας μέσα στον όγκο. Παράγοντες όπως η υποξία και το μικροπεριβάλλον του όγκου συμβάλλουν στην επιγενετική αναπροσαρμογή των καρκινικών και βοηθητικών κυττάρων (όπως καρκινοσχετιζόμενοι ινοβλάστες, ανοσοκύτταρα και ενδοθηλιακά), ενισχύοντας την κακοήγη ανάπτυξη ³.

1.3.13 Πολυμορφικά μικροβιώματα

Το πολυμορφικό μικροβίωμα, δηλαδή το οικοσύστημα που δημιουργείται από μύκητες και βακτήρια στον οργανισμό, διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στο φαινότυπο του καρκίνου. Ορισμένα μικρόβια προκαλούν χρόνια φλεγμονή, επηρεάζουν τον μεταβολισμό των κυττάρων ή τροποποιούν την ανοσολογική απόκριση, βοηθώντας έτσι τον καρκίνο να εξελιχθεί και να εξαπλωθεί. Όταν το μικροβίωμα του οργανισμού χάνει την ομοιόστασή του, δηλαδή όταν υπάρχει δυσβίωση, μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά η αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Ένα παράδειγμα βακτηρίων που συμβάλλουν στην ογκογένεση είναι τα βακτήρια που παράγουν βουτυρικό οξύ, τα οποία παρατηρούνται σε μεγάλη συγκέντρωση σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου ³.

1.3.14 Γηρασμένα κύτταρα

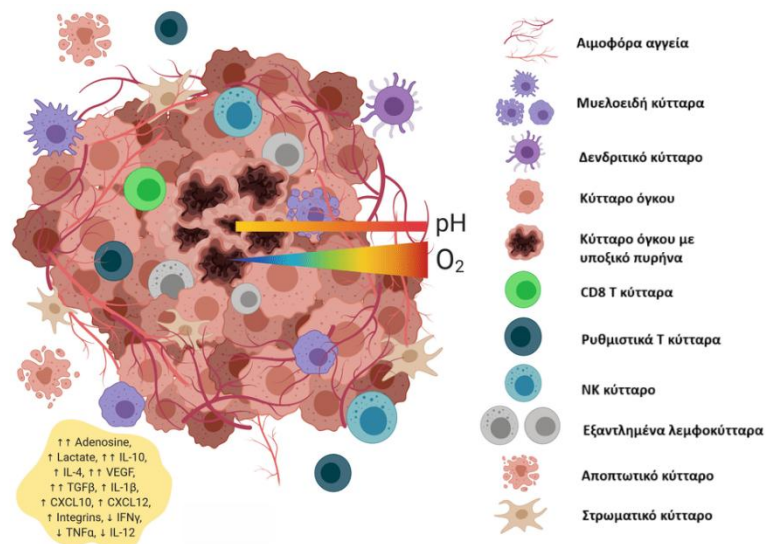
Η κυτταρική γήρανση είναι μια φυσική διαδικασία όπου τα κύτταρα σταματούν να διαιρούνται και αρχίζουν να εμφανίζουν αλλαγές στη μορφή και τη λειτουργία τους. Καθώς τα κύτταρα γερνούν, ενεργοποιούν μια σειρά από αντιδράσεις που περιλαμβάνουν την απελευθέρωση διαφόρων ουσιών, όπως χημειοκινών και κυτοκινών, που εξαρτώνται από τον τύπο του κυττάρου και τον ιστό στον οποίο βρίσκονται. Η γήρανση μπορεί να προκληθεί από παράγοντες όπως η βλάβη του DNA ή από έλλειψη θρεπτικών ουσιών, και θεωρείται ένας προστατευτικός μηχανισμός που βοηθά στην απομάκρυνση κατεστραμμένων ή ανώμαλων κυττάρων, μειώνοντας έτσι τις πιθανότητες ανάπτυξης καρκίνου. Νέες έρευνες ωστόσο δείχνουν ότι τα γηρασμένα κύτταρα δεν είναι πάντα τόσο αμέτοχα στην καρκινογένεση. Μέσω του εκκριτικού φαινοτύπου (Senescence-associated secretory phenotype, SASP), τα γηρασμένα κύτταρα μπορούν να εκκρίνουν σήματα που προάγουν την ανάπτυξη του καρκίνου. Αυτό συμβαίνει καθώς αυτά τα κύτταρα ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, αποτρέπουν την απόπτωση και συμβάλλουν στην αγγειογένεση αλλά και στην μετάσταση. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορούν να "ξεγελάσουν" τον οργανισμό και να αναστρέψουν τη γήρανσή τους, ξεκινώντας και πάλι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αυτή η αναστρέψιμη γήρανση καθώς και οι ινοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα στο μικροπεριβάλλον του όγκου (που επίσης υποβάλλονται σε γήρανση) μπορούν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη και πρόοδο του καρκίνου ³.



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των χαρακτηριστικών γνωρισμάτων του καρκίνου όπως διατυπώθηκαν από τους Hanahan και Weinberg ^{2,3}.

1.4 Το μικροπεριβάλλον του καρκινικού όγκου

Το 1863 ο Rudolf Virchow σύνδεσε την φλεγμονή με τον καρκίνο και έφερε στο φως το μικροπεριβάλλον του καρκινικού όγκου (Tumor Microenvironment, TME). Όμως, το 1889, ο Stephen Paget ανέδειξε την σημαντικότητα και τον ρόλο του στην ανάπτυξη και μετάσταση του καρκίνου. Το μικροπεριβάλλον αυτό αποτελείται από κύτταρα του όγκου, ενδοθηλιακά κύτταρα (π.χ. αιμοφόρων αγγείων), ινοβλάστες και την εξωκυτταρική μήτρα (Extracellular Matrix, ECM). Χαρακτηρίζεται από ανεπαρκή παροχή αίματος, χαμηλή παροχή οξυγόνου (υποξία), όξινες συνθήκες (χαμηλό pH) και εσωτερική μηχανική πίεση (υψηλό ιξώδες). Επίσης παράγει αυξητικούς παράγοντες, πρωτεολυτικά ένζυμα και φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Η δυσκολία των κυττάρων να προσλάβουν θρεπτικές ουσίες και οι συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος οδηγούν τα καρκινικά κύτταρα να επαναπρογραμματίσουν τον μεταβολισμό τους ^{4,5}.



Εικόνα 2: Στοιχεία που χαρακτηρίζουν το μικροπεριβάλλον του καρκινικού όγκου ⁶.

1.4.1 Συνθήκες υποξίας

Η ταχεία ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων σε έναν όγκο οδηγεί στην ανεπαρκή αγγείωση το οποίο με την σειρά του οδηγεί στην ανεπαρκή μεταφορά οξυγόνου στον όγκο. Έτσι, δημιουργείται περιβάλλον υποξίας. Στο εσωτερικό του, τα αιμοφόρα αγγεία περιβάλλονται από καλά οξυγονωμένα (νορμοξικά), ανεπαρκή σε οξυγόνο (υποξικά) και μη οξυγονωμένα (ανοξικά / νεκρωτικά) καρκινικά κύτταρα, στα οποία λόγω των συνθηκών εκφράζεται ένας παράγοντας μεταγραφής, του επαγωγίσιμου από υποξία παράγοντα 1 (Hypoxia-inducible factor-1, HIF-1). Αποτελείται από τις υπομονάδες HIF-1α, της οποίας η έκφραση και ενεργοποίηση προκαλούνται από υποξικά ερεθίσματα, και HIF-1β, η οποία εκφράζεται καταστατικά. Ο HIF-1 συνδέεται με το στοιχείο απόκρισης υποξίας (hypoxia response element, HRE) και προκαλεί την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την αλλαγή του κυτταρικού μεταβολισμού από οξειδωτική σε αναερόβια αναπνοή, την αποφυγή του περιβάλλοντος υποξίας – μετάσταση του καρκίνου και την αγγειογένεση για την “διόρθωση” των συνθηκών υποξίας ⁷.

1.4.2 Περιβάλλον χαμηλού pH

Το pH των καρκινικών κυττάρων διαφέρει από το αντίστοιχο των φυσιολογικών. Συγκεκριμένα, το ενδοκυτταρικό pH είναι παρόμοιο και στις δυο περιπτώσεις ενώ το εξωκυτταρικό pH λαμβάνει τιμές 6.0 με 7.0 (το φυσιολογικό είναι σταθερό με τιμή 7.4 ± 0.5). Η κύρια αιτία της διαφοράς αυτής είναι η αναερόβια γλυκόλυση και η παραγωγή γαλακτικού οξέος που λαμβάνει χώρα (Φαινόμενο Warburg). Επιπλέον, η απομάκρυνση του γαλακτικού οξέος από το κύτταρο, για εξυπηρέτηση του μεταβολικού μονοπατιού, μέσω του μονοκαρβοξυλικού μεταφορέα (MCT) καθώς και η διατάραξη την συγκέντρωσης του όξινου ανθρακικού ιόντος (HCO_3^-), υπεύθυνου για την εξισορρόπηση του pH, είναι αιτίες για τις όξινες συνθήκες στο μικροπεριβάλλον του όγκου ^{8,9}.

1.4.3 Υψηλό ιξώδες

Τα κύτταρα του οργανισμού μας εκτίθενται σε υγρά διαφορετικού ιξώδους (ιξώδες είναι το μέτρο της αντίστασης που προβάλλει ένα υγρό στη σταδιακή παραμόρφωσή του μετά

από τάση) με τιμές από 0.77 cP έως 8.0 cP (centipoise, μονάδα μέτρησης του ιξώδους). Στα καρκινικά κύτταρα ποικίλλει από 1 cP έως 400 cP. Η δραματική αλλαγή οφείλεται στη μη φυσιολογική αποδόμηση των πρωτεϊνών, στην αυξημένη παραγωγή αιμοπεταλίων και λεμφοκυττάρων, στην περίσσεια γαλακτικού οξέος που παράγεται και στις υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών, λιπιδίων και ενζύμων που απαιτούνται και υπερεκφράζονται. Επιπλέον, ο τρόπος πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων επηρεάζουν τα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας και τις εξωκυτταρικές εκκρίσεις, οδηγώντας σε διακυμάνσεις στην τιμή του ιξώδους στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Επίσης, τα καρκινικά κύτταρα που είναι προσαρμοσμένα σε υψηλό ιξώδες, όταν βρεθούν σε φυσιολογικό μπορούν εύκολα να μετακινηθούν οδηγώντας σε μεταστάσεις ^{10,11}.

1.4.4 Το φαινόμενο Warburg

Το φαινόμενο Warburg είναι η διαδικασία όπου τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν αναερόβια γλυκόλυση και ζύμωση γαλακτικού οξέος για παραγωγή ενέργειας. Αυτή η αλλαγή της μεταβολικής οδού, από την οξειδωτική φωσφορυλίωση που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια των φυσιολογικών κυττάρων, οφείλεται στην περιορισμένη παροχή γλυκόζης και οξυγόνου σε όλο τον όγκο. Τα κύτταρα που έχουν καλύτερη οξυγόνωση μέσα στον όγκο καταναλώνουν το γαλακτικό οξύ που απορρίπτεται από τα υποξικά και με την σειρά τους τροφοδοτούν τον μιτοχονδριακό μεταβολισμό ¹².

1.5 Τύποι καρκίνου και κατηγοριοποίησή τους

Υπάρχουν πάνω από 100 τύποι καρκίνου οι οποίοι παίρνουν την ονομασία τους από τα όργανα ή τους ιστούς που σχηματίζονται αρχικά. Επιπρόσθετα, το όνομά τους μπορεί να περιγράφει και τον τύπο κυττάρου που τους σχημάτισε (όπως επιθηλιακό ή πλακώδες) ¹. Οι κύριες κατηγορίες καρκίνων είναι:

- *Το καρκίνωμα.* Είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνου και σχηματίζεται από τα επιθηλιακά κύτταρα τα οποία βρίσκονται στην εσωτερική και εξωτερική επιφάνεια του σώματος. Ανάλογα με τον τύπο του επιθηλιακού κυττάρου όπου ξεκινάει ο καρκίνος έχουμε και διαφορετική ονομασία. Το αδενοκαρκίνωμα είναι καρκίνος που σχηματίζεται από τα επιθηλιακά κύτταρα που παράγουν βλέννα ή υγρά (όπως καρκίνος του μαστού, του παχέος εντέρου, του προστάτη). Το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα που σχηματίζεται στο δέρμα. Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα που σχηματίζεται στα πλακώδη κύτταρα τα οποία βρίσκονται στην επιφάνεια ενός ιστού. Το μεταβατικό κυτταρικό καρκίνωμα που σχηματίζεται στα κύτταρα του ουροθηλίου.
- *Το σάρκωμα.* Είναι καρκίνος που εμφανίζεται στα οστά και τους μαλακούς ιστούς (όπως οστεοσάρκωμα, λειομυοσάρκωμα, σάρκωμα Kaposi, λιποσάρκωμα).
- *Η λευχαιμία.* Είναι ο καρκίνος που ξεκινάει από τον αιμοποιητικό ιστό του μυελού των οστών. Στην περίπτωση αυτή δεν σχηματίζονται όγκοι αλλά μεγάλοι αριθμοί μη φυσιολογικών λευκών αιμοσφαιρίων τα οποία δυσκολεύουν την μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς και στην αντιμετώπιση λοιμώξεων. Διαχωρίζονται σε οξεία ή χρόνια με βάση την ταχύτητα ανάπτυξης και σε λεμφοβλαστικό ή μυελοειδές ανάλογα με τον τύπο κυττάρων που ξεκίνησε.
- *Το λέμφωμα.* Είναι καρκίνος που δημιουργείται στα λεμφοκύτταρα, δηλαδή λευκά αιμοσφαίρια που είναι μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος. Εμφανίζονται

συνήθως σε λεμφαδένες και λεμφαγγεία, και χωρίζονται σε Hodgkin (B-κύτταρα) και μη-Hodgkin (κυρίως B-κύτταρα, αλλά και T-κύτταρα).

- *Το πολλαπλό μυέλωμα.* Είναι γνωστό και ως πλάσματοκυτταρικό ή νόσος Kahler, είναι καρκίνος που ξεκινάει από ένα άλλο είδος τύπο ανοσοκυττάρων, τα κύτταρα πλάσματος. Τα μη φυσιολογικά κύτταρα συσσωρεύονται στον μυελό των οστών και σχηματίζουν όγκους στα οστά.
- *Το μελάνωμα.* Είναι ο τύπος καρκίνου που ξεκινάει από τα μελανοκύτταρα, κύτταρα υπεύθυνα για την παραγωγή μελανίνης.
- *Όγκοι εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού.* Είναι καρκίνος που σχηματίζεται από μη φυσιολογικά κύτταρα στους ιστούς του εγκεφάλου ή του νωτιαίου μυελού. Αυτοί είναι κοινοί τύποι καρκίνου που εμφανίζονται σε άτομα μικρής ηλικίας.
- *Όγκοι γεννητικών κυττάρων.* Είναι όγκοι που ξεκινάνε από κύτταρα από τα οποία αποτελούνται τα σπερματοζωάρια και τα ωάρια.
- *Νευροενδοκρινικοί όγκοι.* Είναι όγκοι που σχηματίζονται στα κύτταρα που απελευθερώνουν ορμόνες.
- *Καρκινοειδείς όγκοι.* Είναι όγκοι βραδείας ανάπτυξης που εντοπίζονται στο γαστρεντερικό σύστημα, πιο συχνά στο ορθό και στο λεπτό έντερο. Οι όγκοι αυτοί μπορεί να εξαπλωθούν στο ήπαρ ή σε άλλα σημεία του σώματος

Παρά τις διάφορες μορφές και περιπτώσεις καρκίνων που υπάρχουν, η Διεθνής Ένωση κατά του Καρκίνου (Union for International Cancer Control, UICC) και η Αμερικανική Επιτροπή για τον Καρκίνο (American Joint Committee on Cancer, AJCC) ανέπτυξαν ένα διεθνώς αποδεκτό πρότυπο διαχωρισμού των καρκινικών όγκων, το TNM (T-Tumor-Όγκος, N-Node-Λεμφαδένες, M-Metastasis-Μεταστάσεις). Ο διαχωρισμός αυτός (Πίνακας 3) βασίζεται στο μέγεθος του όγκου και την τοπική εξάπλωσή του (T), στην επιτοκλή των λεμφαδένων στην περιοχή αυτή (N) και την παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (M). Αυτή η κατηγοριοποίηση δίνει πληροφορίες χρήσιμες για την πρόοδο του καρκίνου και τον τρόπο θεραπείας που θα χρειαστεί. Εξίσου σημαντικός είναι και ο βαθμός διαφοροποίησης του όγκου (G) που βοηθάει στην εύρεση της επιθετικότητάς του ¹³⁻¹⁵.

Πίνακας 3: Πρότυπο διαχωρισμού των καρκινικών όγκων TNM ¹³⁻¹⁵.

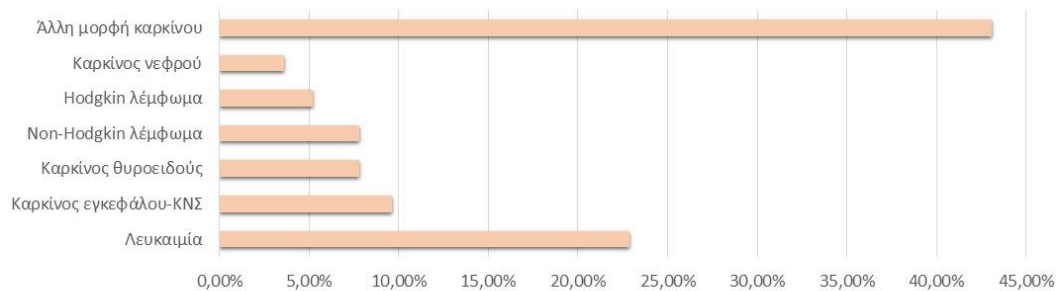
Σύμβολο	Κατηγορίες	Σημασία
T	T0	Δεν υπάρχει πρωτοπαθής όγκος.
	Tis	Καρκίνωμα <i>in situ</i> , δηλαδή είναι εντοπισμένος και δεν έχει εξαπλωθεί τους γύρω ιστούς.
	T1-T4	Μέγεθος/εξάπλωση του όγκου (όσο μεγαλύτερος ο αριθμός, τόσο πιο σοβαρό).
N	N0	Χωρίς προσβεβλημένους λεμφαδένες.
	N1-N3	Βαθμός περιπλοκής λεμφαδένων (όσο μεγαλύτερος, τόσο πιο μεγάλη η περιπλοκή).
M	M0	Χωρίς μεταστάσεις.
	M1	Υπάρχουν μεταστάσεις σε άλλα μέρη του σώματος.

G	G0-G4	Πόσο όμοια είναι τα καρκινικά κύτταρα με τα φυσιολογικά (όσο χαμηλότερο, τόσο πιο όμοια).
----------	--------------	---

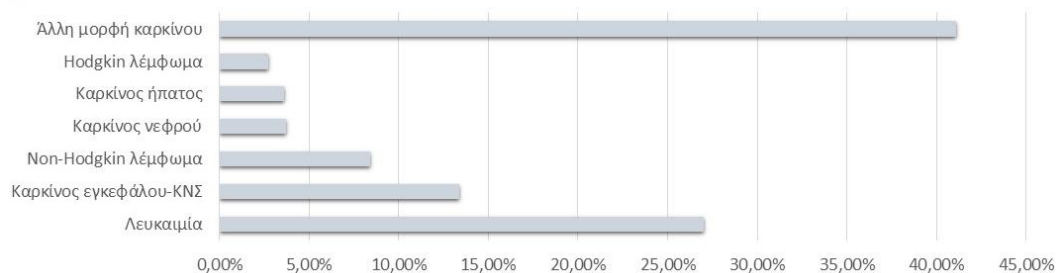
1.6 Στατιστικά που αφορούν τον καρκίνο

Σύμφωνα με το Παγκόσμιο Παρατηρητήριο Καρκίνου (GCO), μια διαδικτυακή πλατφόρμα που παρουσιάζει παγκόσμια στατιστικά για τον καρκίνο, το 2022 διαγνώστηκαν περίπου 20 εκατομμύρια νέα περιστατικά καρκίνου. Οι ασθενείς που απεβίωσαν ανέρχονται στα 10 εκατομμύρια ενώ περίπου 53.4 εκατομμύρια συνάνθρωποι πάσχουν από καρκίνο. Στατιστικά περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου εμφανίζονται στο αρσενικό φύλο με πιο συχνούς τύπους τον καρκίνο του πνεύμονα (15.2 %) και του προστάτη (14.2%) ενώ στο θηλυκό φύλο ο καρκίνος του μαστού (23.8%) και του πνεύμονα (9.4%). Συνολικά σε ηλικίες 5-24 ετών οι τύποι καρκίνου με τα μεγαλύτερα ποσοστά εμφάνισης είναι η λευχαιμία (πρώτη σε θνησιμότητα), ο καρκίνος στον εγκέφαλο-ΚΝΣ (δεύτερος σε ποσοστό θνησιμότητας), και ο καρκίνος του θυροειδούς. Αντίστοιχα σε ηλικίες 25 με 84+ ετών είναι ο καρκίνος του πνεύμονα (πρώτος σε θνησιμότητα), του μαστού, και του παχέος εντέρου (δεύτερος σε θνησιμότητα) ¹⁶.

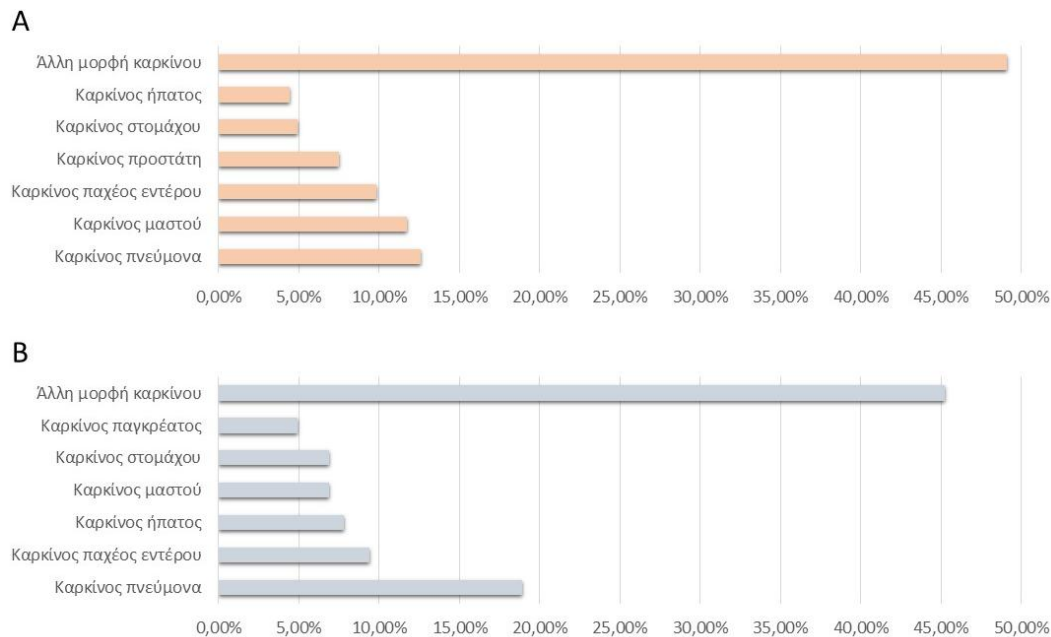
A



B



Εικόνα 3: (Α) Ποσοστά τύπων καρκίνου σε ηλικίες 5-24 ετών, (Β) Θνησιμότητα τύπων καρκίνου σε ηλικίες 5-24 ετών ¹⁶.



Εικόνα 4: (Α) Ποσοστά τύπων καρκίνου σε ηλικίες 25-85+ ετών, (Β) Θνησιμότητα τύπων καρκίνου σε ηλικίες 25-85+ ετών ¹⁶.

1.7 Διάγνωση του καρκίνου

Ο καρκίνος μπορεί να προκαλέσει διάφορα συμπτώματα στον άνθρωπο, αλλά πολλά από αυτά σχετίζονται και με άλλες παθήσεις. Μερικά συνηθισμένα σημάδια περιλαμβάνουν αλλαγές στο στήθος, την ουροδόχο κύστη ή το έντερο, ανεξήγητες αιμορραγίες ή μώλωπες, επίμονο βήχα, δυσκολία στο φαγητό, υπερβολική κόπωση, πυρετούς, πληγές στο στόμα, νευρολογικά προβλήματα, αλλαγές στο δέρμα, πρηξίματα ή εξογκώματα και απότομη απώλεια ή αύξηση βάρους. Λόγω της σοβαρής φύσης της νόσου του καρκίνου, επιστήμονες και γιατροί οδηγήθηκαν στην εύρεση και δημιουργία μεθόδων, πέρα από την παρατήρηση των φυσικών συμπτωμάτων, για την γρήγορη και έγκαιρη διάγνωσή του. Αυτές οι μέθοδοι διακρίνονται σε εργαστηριακές εξετάσεις, βιοψία και μέθοδοι απεικόνισης ¹⁷.

1.7.1 Εργαστηριακές εξετάσεις

Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται εξετάσεις όπως η ανάλυση αίματος, ούρων ή άλλων σωματικών υγρών, προκειμένου να ανιχνευθεί η παρουσία ή η απουσία συγκεκριμένων βιοδεικτών καθώς αυξημένα ή μειωμένα επίπεδα αυτών μπορεί να υποδηλώνουν την ύπαρξη μιας ασθένειας, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Αν και οι εξετάσεις αυτές είναι ένας αρχικός δείκτης για ύπαρξη καρκίνου, τα αποτελέσματα δεν είναι πάντα ορθά και για αυτό οι ασθενείς συνίσταται να προβούν και σε άλλες μεθόδους διάγνωσης ¹⁷.

1.7.2 Βιοψία

Η βιοψία είναι μια διαδικασία όπου αφαιρείται δείγμα ιστού για ανάλυση ώστε να προσδιοριστεί αν πρόκειται για κακοήθεια και ποιος είναι ο τύπος του καρκίνου. Η συλλογή του δείγματος μπορεί να γίνει με βελόνα (για αναρρόφηση ιστού ή υγρών), με ενδοσκόπηση (όπου μια κάμερα εξετάζει εσωτερικές περιοχές του σώματος και επιτρέπει τη λήψη δείγματος) ή μέσω χειρουργικής επέμβασης (όταν απαιτείται αφαίρεση ιστού για εξέταση).

Κάθε μέθοδος επιλέγεται ανάλογα με την περίπτωση, συμβάλλοντας μαζί με τα υπόλοιπα αποτελέσματα στην ακριβή διάγνωση και κατ' επέκταση την κατάλληλη θεραπεία ¹⁷.

1.7.3 Μέθοδοι απεικόνισης

Με τις μεθόδους απεικόνισης λαμβάνονται εικόνες από το εσωτερικό του οργανισμού χωρίς χειρουργική επέμβαση. Οι εικόνες αυτές βοηθάνε τους γιατρούς να εξακριβώσουν την ύπαρξη καρκινικού όγκου ¹⁷.

1.7.3.1 Η αξονική τομογραφία (Computed Tomography, CT Scan)

Στην αξονική τομογραφία χρησιμοποιείται μια συσκευή ακτινών Χ συνδεδεμένη με υπολογιστή για τη λήψη πολλαπλών εικόνων των επιθυμητών οργάνων από διάφορες γωνίες. Οι εικόνες αυτές συνδυάζονται για τη δημιουργία λεπτομερών τρισδιάστατων απεικονίσεων του εσωτερικού του σώματος. Σε ορισμένες περιπτώσεις πριν από τη σάρωση, μπορεί να χορηγηθεί στον ασθενή ένα ειδικό σκιαγραφικό υλικό, είτε με κατάποση είτε μέσω ένεσης σε φλέβα. Το υλικό αυτό βοηθά στην καλύτερη ανάγνωση των εικόνων, αναδεικνύοντας συγκεκριμένες περιοχές του σώματος ¹⁷.

1.7.3.2 Μαγνητική τομογραφία (Magnetic Resonance Imaging, MRI)

Η μαγνητική τομογραφία χρησιμοποιεί ραδιοκύματα και έναν ισχυρό μαγνήτη για την λήψη εικόνων σε “φέτες”. Ο συνδυασμός των εικόνων δίνει μία λεπτομερή εικόνα του εσωτερικού του σώματος και την ακριβή τοποθεσία του όγκου. Και σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται ειδικό σκιαγραφικό υλικό για πιο έντονη και διακριτή απεικόνιση του όγκου ¹⁷.

1.7.3.3 Πυρηνική σάρωση (Nuclear Scan)

Στην πυρηνική σάρωση (αλλιώς και σάρωση ραδιοϊσοτόπων) ο ασθενής λαμβάνει με ένεση μικρή ποσότητα ραδιενεργού σκιαγραφικού υλικού το οποίο μέσω των αιμοφόρων αγγείων μεταφέρεται και συσσωρεύεται σε συγκεκριμένο όργανο ή στα οστά. Στην συνέχεια το μηχάνημα ανιχνεύει και μετράει την ραδιενέργεια του σώματος και δημιουργεί εικόνες του επιθυμητού σημείου. Το ραδιενεργό υλικό δεν δημιουργεί παρενέργειες και μετά από μικρό χρονικό διάστημα αποβάλλεται από τον οργανισμό ¹⁷.

1.7.3.4 Σάρωση οστών (Bone Scan)

Ένας τύπος πυρηνικής σάρωσης είναι η σάρωση οστών. Με αυτή γίνεται έλεγχος για ανωμαλίες ή ζημιές στα κόκαλα που προκλήθηκαν από καρκίνο των οστών ή από μετάσταση καρκίνου στα οστά από άλλο σημείο του σώματος ¹⁷.

1.7.3.5 Τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (Positron Emission Tomography, PET Scan)

Άλλη μία μορφή πυρηνικής σάρωσης είναι η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων. Στην πλειοψηφία των απεικονίσεων PET γίνεται χορήγηση μίας ραδιενεργής μορφής της γλυκόζης (¹⁸F-Fluorodeoxyglucose). Τα καρκινικά κύτταρα λαμβάνουν μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκόζης για να καλυφθούν οι ενεργειακές τους ανάγκες. Αποτέλεσμα της σάρωσης αυτής είναι μία λεπτομερής τρισδιάστατη εικόνα περιοχών του σώματος όπου έχει γίνει μεγαλύτερη συσσώρευση γλυκόζης, δηλαδή υπάρχει καρκινικός όγκος ¹⁷.

1.7.3.6 Μονοφωτονιακή τομογραφία εκπομπής (Single photon emission computed tomography, SPECT)

Η μέθοδος SPECT έχει πολλά κοινά με την μέθοδο PET. Και σε αυτή την περίπτωση γίνεται χορήγηση ραδιενεργού σκιαγραφικού υλικού στον ασθενή. Γύρω από το σημείο που πρέπει να γίνει απεικόνιση περιστρέφονται κάμερες ακτινών γ (ακτίνες γ είναι υψηλής ενέργειας φωτόνιο που εκπέμπεται μαζί με την εκπομπή α- και β-σωματιδίων από το ραδιονουκλίδιο). Η εικόνα που λαμβάνεται (σπινθηρογράφημα) ανακατασκευάζεται στον τρισδιάστατο χώρο και συνδυάζοντας την με πληροφορίες από την αξονική τομογραφία (SPECT/CT) έχουμε την βιοκατανομή του ραδιονουκλιδίου στον χώρο με καλύτερη ανάλυση λαμβάνοντας καλύτερες και περισσότερες πληροφορίες, άρα και καλύτερη διάγνωση ¹⁸.

1.7.3.7 Υπέρηχος (Ultrasound, US)

Στον υπέρηχο γίνεται χρήση ηχητικών κυμάτων υψηλής ενέργειας τα οποία ανακλώνται από τους εσωτερικούς ιστούς. Τα ανακλώμενα κύματα λαμβάνονται από το ειδικό μηχάνημα και ο υπολογιστής δημιουργεί σε πραγματικό χρόνο την εικόνα του εσωτερικού του οργανισμού, γνωστό ως υπερηχογράφημα. Η εικόνα που λαμβάνεται κάθε φορά καθορίζεται από την περιοχή που στοχεύει ο γιατρός κατά την εξέταση ¹⁷.

1.7.3.8 Ακτινογραφίες (X-rays)

Στην ακτινογραφία γίνεται χρήση χαμηλών δόσεων ακτινοβολίας για την δημιουργία εικόνων του εσωτερικού του σώματος. Το σημείο που χρειάζεται να γίνει απεικόνιση τοποθετείται μπροστά στο ακτινογραφικό φιλμ και μια πηγή ακτίνων X το ακτινοβολεί σε διαφορετική απόσταση και χρόνο ανάλογα την εξέταση. Στην εικόνα που λαμβάνεται, ο αέρας αποτυπώνεται με μαύρο ενώ τα συμπαγή σημεία (όπως οστά ή όγκος) άσπρα ¹⁷.

1.7.4 Οπτική απεικόνιση μέσω φθορισμού - φωσφορισμού

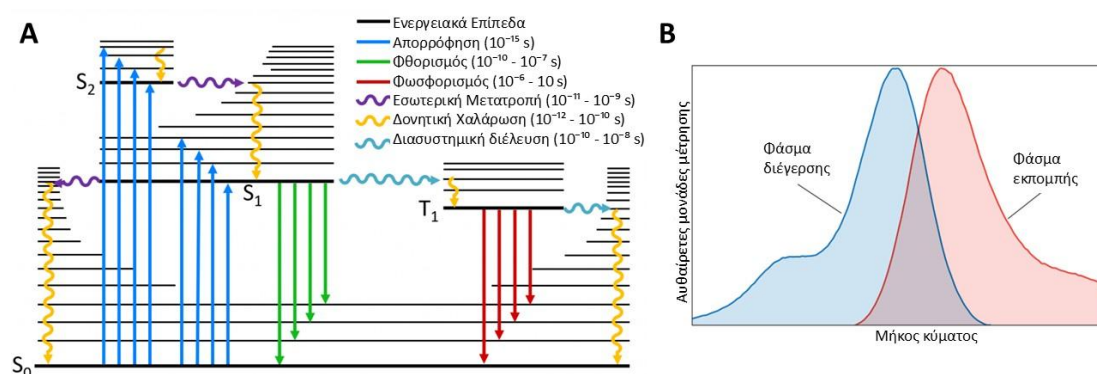
Τα τελευταία χρόνια οι ερευνητές εξερευνούν μία νέα μέθοδο οπτικής απεικόνισης των καρκινικών όγκων μέσω της φασματομετρίας υπεριώδους ορατού – ορατού (UV-Vis spectroscopy) και φασματομετρίας φθορισμού (Fluorescence spectroscopy). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω οργανικών μορίων που αντιδρούν εκλεκτικά με βιοδείκτες των καρκινικών κυττάρων ή επηρεάζονται από χαρακτηριστικά του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος ¹⁹.

1.7.4.1 Φασματομετρία UV-Vis / Φασματομετρία Φθορισμού

Όλα τα οργανικά μόρια μπορούν να απορροφήσουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με αποτέλεσμα την μετάπτωση τους σε μία διεγερμένη κατάσταση. Κάθε μόριο έχει ηλεκτρονιακές, δονητικές και περιστροφικές καταστάσεις. Όταν δοθεί στο μόριο ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, επειδή οι καταστάσεις είναι κβαντισμένες, αυτό απορροφά ενέργεια ίση με την διαφορά των δυο καταστάσεων-αυτήν που βρισκόταν πριν και αυτή που θα βρεθεί μετά την διέγερση. Στην φασματομετρία UV-Vis παρατηρούμε την απορρόφηση αυτή. Ο χρόνος ημιζωής μιας διεγερμένης κατάστασης είναι της τάξης των nano- ή pico-δευτερολέπτων. Η απορρόφηση σε μήκη κύματος από 180 nm έως 780 nm είναι αποτέλεσμα αλληλεπιδράσεων φωτονίων – ηλεκτρονίων τα οποία συμμετέχουν στον δεσμό με άτομα όπως το οξυγόνο, θείο, άζωτο, αλογόνα, ή βρίσκονται κοντά σε αυτά. Πιο συγκεκριμένα το μήκος κύματος εξαρτάται από τον βαθμό δέσμευσης

των ηλεκτρονίων στο μόριο (ηλεκτρόνια των δεσμών C-C, C-H απορροφούν στα 180 nm). Το μειονέκτημα σε αυτές τις τιμές είναι ότι το σήμα είναι ανακριβές καθώς εκεί απορροφά και το ατμοσφαιρικό οξυγόνο. Όμως, ηλεκτρόνια που συμμετέχουν σε πολλαπλούς δεσμούς χρειάζονται λιγότερη ενέργεια για διέγερση άρα και μεγαλύτερο μήκος κύματος απορρόφησης (όσο μικρότερο μήκος κύματος τόσο μεγαλύτερη η ενέργεια). Η φασματομετρία UV-Vis μπορεί να εφαρμοστεί σε ευρύ φάσμα μορίων με καλή ευαισθησία, καλή ακρίβεια, αρκετά υψηλή εκλεκτικότητα και ευκολία στην χρήση ¹⁹.

Με τον όρο φωτοφωταύγεια, χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε εκπομπή φωτός χωρίς θέρμανση. Ο φθορισμός είναι μια διαδικασία φωτοφωταύγειας κατά την οποία τα μόρια που διεγείρονται από την απορρόφηση ακτινοβολίας επανέρχονται στην θεμελιώδη κατάσταση εκπέμποντας την ενέργεια με μορφή φωτονίων. Πιο αναλυτικά, κατά την ακτινοβολήση το μόριο απορροφά φωτόνιο κατάλληλης ενέργειας και το ηλεκτρόνιο από την βασική κατάσταση S_0 πηγαίνει σε κάποια δονητική υποστάθμη της απλής διεγερμένης ηλεκτρονιακής υποστάθμης S_1 (ή της S_2). Στην συνέχεια ακολουθεί μη-ακτινοβολούσα δονητική αποδιέγερση στην βασική δονητική υποστάθμη της S_1 και προοδευτικά το διεγερμένο ηλεκτρόνιο επιστρέφει στη κατάσταση S_0 εκπέμποντας φωτόνιο, οδηγώντας στον λεγόμενο φθορισμό. Η εκπομπή είναι χαμηλότερης ενέργειας, συγκριτικά με την διέγερση καθώς μέρος της ενέργειας διέγερσης χάνεται ως μη ακτινοβολούσα αποδιέγερση. Επομένως το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής θα είναι μεγαλύτερο σε σχέση με εκείνο της διέγερσης. Η διαφορά αυτή στα νανόμετρα ονομάζεται μετατόπιση Stokes (Stokes Shift). Ο Πολωνός φυσικός Aleksander Jablonski ανέπτυξε το ομώνυμο διάγραμμα, ένα μέσο οπτικοποίησης των οδών - μηχανισμών απώλειας ενέργειας των διεγερμένων μορίων και για τη βοήθεια στην ερμηνεία των φασμάτων φθορισμού τους. Σε αντίθεση με την φασματομετρία UV-Vis, η φασματοσκοπία φθορισμού έχει πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία και για αυτό χρησιμοποιείται ευρέως στην κυτταρική απεικόνιση και κατ' επέκταση στην διάγνωση των καρκινικών όγκων ¹⁹.

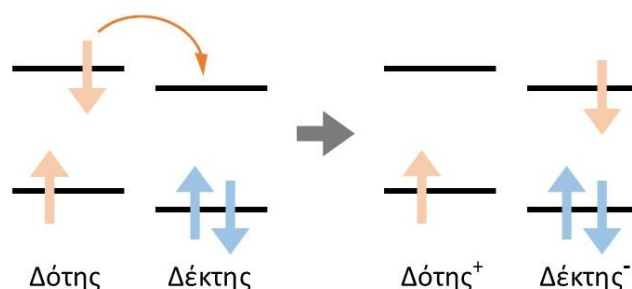


Εικόνα 5: (Α) Διάγραμμα Jablonsky όπου φαίνονται οι ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις, (Β) Διάγραμμα διέγερσης και εκπομπής όπου φαίνεται η μετατόπιση Stokes ^{20,21}.

1.7.4.2 Φωτοεπαγόμενη Μεταφορά Ηλεκτρονίων, PET

Κατά την φωτοεπαγόμενη μεταφορά ηλεκτρονίων (Photo-induced Electron Transfer, PET) λαμβάνει χώρα μεταφορά ηλεκτρονίων από έναν δότη (Donor, D) διεγερμένο (D^*) προς την διεγερμένη κατάσταση ενός δέκτη (Acceptor, A) που βρίσκεται στην θεμελιώδη. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η αλληλοεπικάλυψη των μοριακών τροχιακών του δότη και του δέκτη. Αυτή η μεταφορά ηλεκτρονίου από τα υψηλότερα κατειλημμένα μοριακά

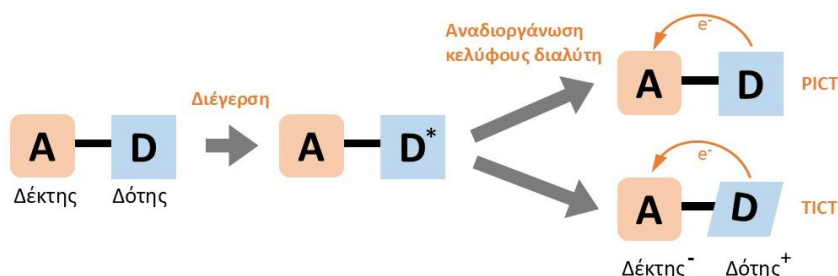
τροχιακά (Highest Occupied Molecular Orbitals, HOMO) του διεγερμένου δότη προς τα χαμηλότερα μη κατειλημμένα μοριακά τροχιακά (Lowest Unoccupied Molecular Orbitals, LUMO) του δέκτη μπορεί να γίνει και ενδομοριακά και διαμοριακά ²².



Εικόνα 6: Σχήμα λειτουργίας της φωτοεπαγόμενης μεταφοράς ηλεκτρονίων (PET).

1.7.4.3 Ενδομοριακή Μεταφορά Φορτίου, ICT

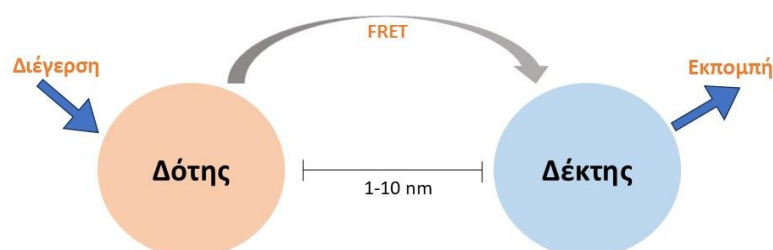
Στην ενδομοριακή μεταφορά φορτίου (Intra-molecular Charge Transfer, ICT) έχουμε ένα μοριακό σύστημα δότης - π γέφυρα - δέκτης (D-π-A) και ενδομοριακή μεταφορά φορτίου από τον διεγερμένο δότη στον δέκτη. Έτσι, έχουμε αύξηση της μοριακής διπολικής ροπής καθώς εντοπίζονται ένα θετικό και ένα αρνητικό φορτίο στα άκρα του συστήματος. Οι φωτοεπαγόμενες ενδομοριακές μεταφορές φορτίου σε ένα μόριο χαρακτηρίζονται από δομικές αναδιοργανώσεις προκειμένου να προσαρμοστεί στη νέα κατανομή ηλεκτρονικής πυκνότητας. Η διαδικασία μεταφοράς φορτίου στο σύστημα D-π-A γίνεται με επιτεδοποίηση ή συστρόφη. Παρατηρούνται λοιπόν επίπεδη ενδομοριακή μεταφορά φορτίου (Planar Intramolecular Charge Transfer, PICT) ή συστραμμένη ενδομοριακή μεταφορά φορτίου (Twisted Intramolecular Charge Transfer, TICT). Η διεγερμένη κατάσταση των συστημάτων ICT έχει πολλές φορές ισχυρότερη διπολική ροπή από τη θεμελιώδη. Έτσι, η διαλυτότητα που ήταν ιδανική για τη θεμελιώδη κατάσταση δεν είναι πλέον για τη διεγερμένη. Όμως επειδή η διεγερμένη κατάσταση διαρκεί αρκετά, έχουμε αναδιοργάνωση του κελύφους διαλυτοποίησης με αποτέλεσμα η διαλυτότητα να επανέρχεται σε ιδανικό επίπεδο. Αυτό μειώνει την ενέργεια της διεγερμένης κατάστασης αλλά η εκπομπή φθορισμού είναι ταχύτερη και το κέλυφος του διαλύτη δεν μπορεί να αναδιοργανωθεί όταν επιστρέφει στη βασική κατάσταση. Με τη σειρά του αυτό αυξάνει τη σχετική ενέργεια της αρχικά σχηματισμένης θεμελιώδους κατάστασης, η οποία μειώνει περαιτέρω το ενεργειακό χάσμα. Αυτές οι επιδράσεις οδηγούν σε εκπομπή μεγαλύτερου μήκους κύματος ²³.



Εικόνα 7: Σχήμα λειτουργίας της φωτοεπαγόμενης μεταφοράς ηλεκτρονίων (PET).

1.7.4.4 Μεταφορά ενέργειας μέσω συντονισμού Förster, FRET

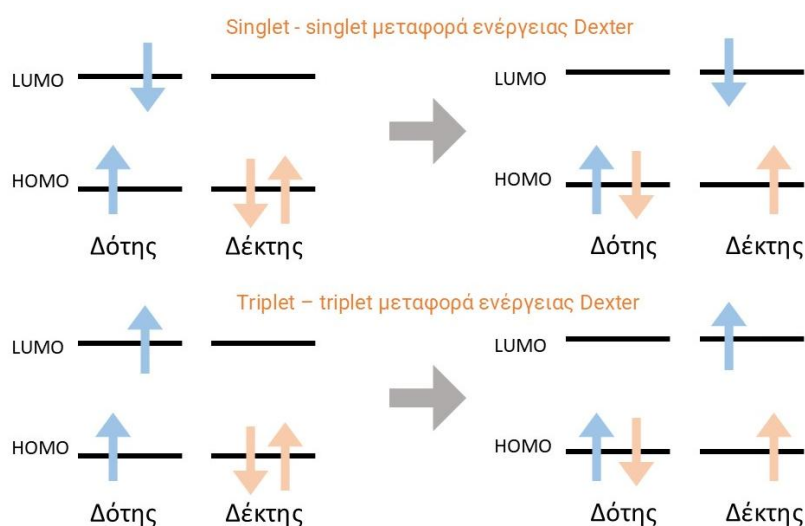
Η βασική αρχή της μεταφοράς ενέργειας μέσω συντονισμού Förster (Förster resonance energy transfer, FRET) βασίζεται στην μεταφορά της ενέργειας της διεγερμένης κατάστασης ενός φθοροφόρου μορίου - δότη προς την χαμηλότερης ενέργειας διεγερμένη κατάσταση ενός άλλου φθοροφόρου μορίου - δέκτη, το οποίο βρίσκεται σε απόσταση 1-10 nm. Αυτή η μεταφορά ενέργειας δεν είναι φαινόμενο εκπομπής - απορρόφησης φωτονίων αλλά αποτέλεσμα αλληλεπιδράσεων διπόλου – διπόλου καθώς το δίπολο του δότη επάγει τον σχηματισμό του διπόλου του δέκτη ^{23,24}.



Εικόνα 8: Σχήμα λειτουργίας της μεταφοράς ενέργειας συντονισμού Förster (FRET).

1.7.4.5 Μεταφορά ενέργειας Dexter, DET

Στην μεταφορά ενέργειας Dexter (Dexter energy transfer, DET) ένα ηλεκτρόνιο από το LUMO τροχιακό του διεγερμένου δότη μεταφέρεται στο LUMO τροχιακό του δέκτη. Αμέσως μετά, ένα ηλεκτρόνιο από το τροχιακό HOMO του δέκτη μεταφέρεται στο HOMO τροχιακό του δότη και το ίδιο καταλήγει σε διεγερμένη κατάσταση. Αν και ομοιάζει πολύ με το φαινόμενο FRET, η μεταφορά ενέργειας Dexter είναι κβαντομηχανικό φαινόμενο ²⁵.



Εικόνα 9: Σχήμα λειτουργίας της μεταφοράς ενέργειας συντονισμού Dexter (DET).

1.8 Τύποι θεραπείας κατά του καρκίνου

Μετά την διάγνωση ενός ασθενή με καρκίνο ακολουθεί το εξίσου σημαντικό κομμάτι της θεραπείας. Ο τύπος της θεραπείας διαλέγεται με βάση το είδος και το στάδιο που βρίσκεται ο καρκίνος. Ορισμένοι ασθενείς χρειάζονται μια μόνο θεραπεία αλλά η πλειοψηφία λαμβάνει συνδυασμό θεραπειών. Επιπλέον, εκτός από την αντιμετώπιση του καρκίνου έχουμε και εξομάλυνση των συμπτωμάτων που προκαλεί ²⁶.

1.8.1 Χημειοθεραπεία

Η χημειοθεραπεία είναι από τις πιο γνωστές μορφές θεραπείας του καρκίνου. Γίνεται χορήγηση φαρμάκων, τα οποία καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα, ενδοφλέβια ή από το στόμα. Το μειονέκτημα αυτής είναι η χαμηλή εκλεκτικότητα, καθώς καταστρέφει και τα υγιή κύτταρα ²⁶.

1.8.2 Ορμονοθεραπεία

Είναι τύπος θεραπείας κατά των καρκίνων που εξαρτώνται από ορμόνες για την ανάπτυξή τους (όπως ο καρκίνος του μαστού και του προστάτη). Γίνεται χορήγηση φαρμάκων τα οποία μπλοκάρουν την πρόσληψη των ορμονών, αναστέλλοντας την ανάπτυξη του καρκίνου ²⁶.

1.8.3 Υπερθερμία

Στην υπερθερμία, η θερμοκρασία του σώματος ή της περιοχής του όγκου αυξάνεται στους 45°C. Η αύξηση αυτή καταστρέφει τα καρκινικά κύτταρα ή τα κάνει πιο ευάλωτα σε άλλες μορφές θεραπείας χωρίς να επηρεάζει τα φυσιολογικά ²⁶.

1.8.4 Ανοσοθεραπεία

Η ανοσοθεραπεία είναι μια μέθοδος θεραπείας η οποία ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα, ενεργοποιεί τα Τ-λεμφοκύτταρα, ώστε να μπορέσει ο οργανισμός να αναγνωρίσει και να καταστρέψει τα καρκινικά κύτταρα ²⁶.

1.8.5 Φωτοδυναμική Θεραπεία

Στην φωτοδυναμική θεραπεία χρησιμοποιείται ένα φωτοευαίσθητο φάρμακο σε συνδυασμό με ακτινοβολία με λέιζερ, η οποία ενεργοποιεί το φάρμακο και καταστρέφει τα καρκινικά κύτταρα. Χρησιμοποιείται κυρίως για επιφανειακούς καρκίνους, όπως καρκίνος του δέρματος ²⁶.

1.8.6 Ακτινοθεραπεία

Στην ακτινοθεραπεία χρησιμοποιούνται υψηλές δόσεις ακτινοβολίας για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων ²⁶.

1.8.7 Μεταμόσχευση Βλαστοκυττάρων Αίματος

Αυτός ο τύπος θεραπείας περιλαμβάνει την μεταμόσχευση υγιών αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων σε άτομα που έχουν καταστραφεί τα δικά τους από υψηλές δόσεις χημειοθεραπείας ή ακτινοθεραπείας. Κύρια χρήση έχει στους αιματολογικούς καρκίνους (όπως η λευχαιμία) ²⁶.

1.8.8 Χειρουργική αφαίρεση του καρκίνου

Μία από τις πρώτες μορφές θεραπείας είναι η χειρουργική επέμβαση. Σε αυτή ο χειρουργός αφαιρεί τον καρκινικό όγκο από το σώμα. Για βέλτιστα αποτελέσματα γίνεται συνδυασμός με άλλες θεραπείες, όπως χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία ²⁶.

1.8.9 Στοχευμένη Θεραπεία

Στην στοχευμένη θεραπεία αξιοποιούνται συγκεκριμένα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων. Γίνεται στόχευση συγκεκριμένων μορίων, οργανιδίων ή μηχανισμών ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων. Η μέθοδος αυτή παρέχει καλύτερη εκλεκτικότητα και λιγότερες παρενέργειες. Σε αυτόν τον τύπο θεραπείας γίνεται χρήση είτε μικρών οργανικών μορίων – φαρμάκων, όπου το μικρό τους μέγεθος τα βοηθάει να εισέρχονται εύκολα στα κύτταρα, είτε μονοκλωνικών αντισωμάτων (Monoclonal Antibodies, mAbs), δηλαδή πρωτεΐνες που έχουν σχεδιαστεί για συγκεκριμένους στόχους στα καρκινικά κύτταρα. Ορισμένα μονοκλωνικά αντισώματα κάνουν τα καρκινικά κύτταρα ορατά στο ανοσοποιητικό σύστημα ώστε αυτό να τα καταστρέψει. Άλλα, σταματούν άμεσα την ανάπτυξη τους ή τα οδηγούν σε απόπτωση. Παρακάτω παρουσιάζονται κάποια παραδείγματα φαρμάκων (Πίνακας 4) και μονοκλωνικών αντισωμάτων (Πίνακας 5) που έχουν σχεδιαστεί για στόχευση των καρκινικών κυττάρων και κατ' επέκταση θεραπεία του καρκίνου ²⁷.

Πίνακας 4: Παραδείγματα μικρών οργανικών μορίων – φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην στοχευμένη θεραπεία ²⁶.

Μικρά οργανικά μόρια-φάρμακα	Στόχευση	Τύπος καρκίνου
Imatinib (Gleevec)	Κινάση Tyroσίνης BCR-ABL	Χρόνια μυελογενή λευχαιμία (CML).
Erlotinib (Tarceva)	Υποδοχέα του Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα (EGFR)	Καρκίνος του πνεύμονα και του παγκρέατος.
Lapatinib (Tykerb)	Διπλός αναστολέας των HER2 και EGFR	HER2-θετικό καρκίνο του μαστού.
Venetoclax (Venclexta)	Γονίδιο BCL-2	Κυρίως στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (CLL). Προκαλεί απόπτωση στα λευχαιμικά κύτταρα.
Osimertinib (Tagrisso)	Στοχεύει μεταλλάξεις του EGFR (T790M)	Μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.
Dabrafenib (Tafinlar)	BRAF V600E κινάση	Μελάνωμα και μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

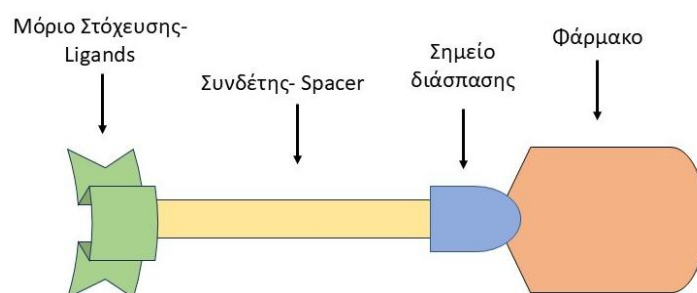
Πίνακας 5: Παραδείγματα μονοκλωνικών αντισωμάτων με χρήση στην στοχευμένη θεραπεία ²⁸.

Μονοκλωνικά αντισώματα	Στόχευση	Τύπος καρκίνου
Trastuzumab (Herceptin)	Υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (HER2)	HER2-θετικό καρκίνο του μαστού και του στομάχου.
Bevacizumab (Avastin)	Αγγειακό Ενδοθηλιακό Αυξητικό Παράγοντα (VEGF)	Αναστέλλει την αγγειογένεση σε όγκους όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου και του πνεύμονα.
Rituximab (Rituxan)	Αντιγόνο CD20 σε B-λεμφοκύτταρα	Μη-Hodgkin λεμφώματα και χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία.

Cetuximab (Erbix)	Υποδοχέα του Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα (EGFR)	Καρκίνος του παχέος εντέρου και καρκίνο της κεφαλής και τραχήλου.
Pembrolizumab (Keytruda)	Υποδοχέας PD-1	Ενίσχυση της ανοσολογική απόκριση, χρησιμοποιείται σε διάφορους τύπους καρκίνου.
Daratumumab (Darzalex)	CD38, Κυκλική Υδρολάση Ριβόζης ADP	Πολλαπλούν μυέλωμα.

1.8.10 Θεραπεία με συζεύγματα φαρμάκου - μορίου στόχευσης

Στην Θεραπεία με συζεύγματα φαρμάκου - μορίου στόχευσης (Ligand-targeted therapy) γίνεται χρήση μοριακών προσδετών (Ligands) για στόχευση και αλληλεπίδραση με συγκεκριμένους στόχους στα καρκινικά κύτταρα. Εκμεταλλεύεται χαρακτηριστικά στην επιφάνεια των κυττάρων, όπως οι υποδοχείς ή άλλες πρωτεΐνες, με σκοπό την αντιμετώπιση του καρκίνου χωρίς την επιρροή σε άλλους ιστούς του σώματος. Τα ligands συνδέονται συνήθως μέσω μίας αλειφατικής αλυσίδας με το φάρμακο που θα χορηγηθεί. Ανάμεσα από το φάρμακο και την αλυσίδα υπάρχει το σημείο διάσπασης, το οποίο υποδηλώνει που θα διασπαστεί το αρχικό μόριο για την απελευθέρωση του φαρμάκου εντός του καρκινικού όγκου (μόρια επονομαζόμενα προφάρμακα). Αυτή η μέθοδος θεραπείας είναι να είναι πιο ακριβής και αποτελεσματική από τις παραδοσιακές θεραπείες, ελαχιστοποιώντας τη βλάβη που συνήθως προκαλείται στους υγιείς ιστούς γύρω από τον κακοήγη όγκο ²⁹.

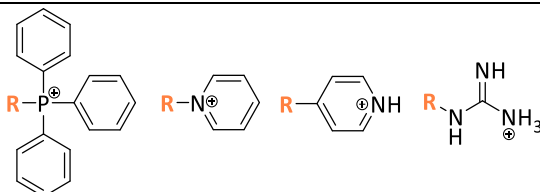
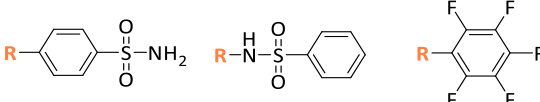


Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση των συμπλεγμάτων που χρησιμοποιούνται στην θεραπεία με συμπλέγματα φάρμακο - μόρια στόχευσης.

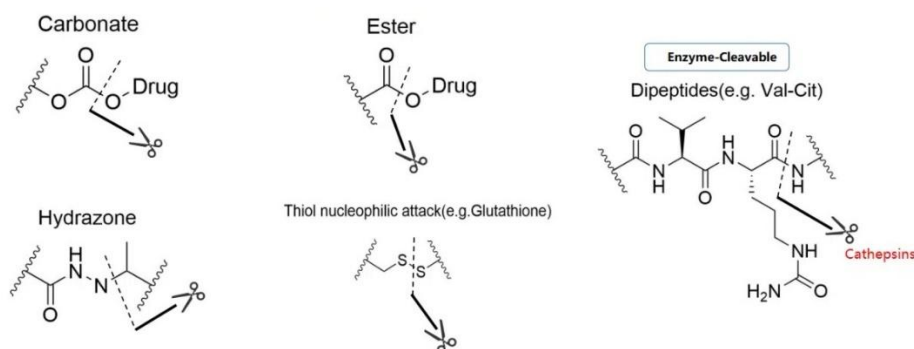
Στην θεραπεία αυτή, τα μόρια στόχευσης σχεδιάζονται καθαρά για αυτό τον ρόλο. Είναι οργανικά μόρια και φέρουν ομάδες που θα τα επιτρέψουν να εισέλθουν στο εσωτερικό των καρκινικών κυττάρων και να συσσωρευτούν στα οργάνδια του κυττάρου που στοχεύουμε. Τέτοιες ομάδες αναγράφονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Παραδείγματα λειτουργικών ομάδων και τα οργάνδια που στοχεύουν ³⁰⁻³³.

Οργάνδιο στόχευσης	Λειτουργικές ομάδες
Λυσοσώματα	$\text{R-N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{NH} \end{array}$ $\text{R-N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \end{array}$ $\text{R-N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{ } \end{array}$ $\text{R-N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{ } \end{array}$

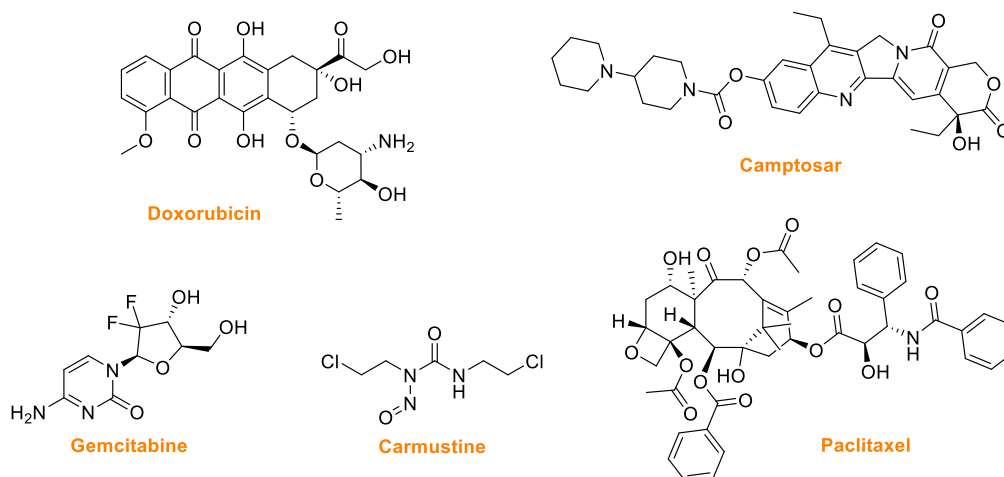
Μιτοχόνδρια	
Ενδοπλασματικό δίκτυο	

Ως σύνδεσμοι χρησιμοποιούνται δεσμοί που μπορούν να διασπαστούν στο εσωτερικό των καρκινικών κυττάρων είτε λόγω των διαφορετικών συνθηκών είτε από κάποιο ένζυμο. Τέτοιοι δεσμοί είναι ο καρβονικός εστέρας (Carbonate) και ο εστέρας (Ester) που διασπώνται μέσω υδρόλυσης, συχνά από τα ένζυμα εστεράσες, η υδραζόνη (Hydrazone) η οποία διασπάται σε όξινο περιβάλλον (π.χ. στα λυσοσώματα), δισουλφιδικός δεσμός ο οποίος δέχεται πυρηνόφιλες προσβολές από ενώσεις όπως η γλουταθειόνη και τέλος τα διπεπτίδια (dipeptides) όπως Val-Cit όπου μέσω ενζυμικής διάσπασης από καθεψίνες (πρωτεάσες που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες αμινοξέων) απελευθερώνουν το φάρμακο ³⁴.



Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση των δεσμών που χρησιμοποιούνται ως σημεία διάσπασης και απελευθέρωσης του φαρμάκου ³⁴.

Τέλος, ως φάρμακα μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλές και διάφορες κυτταροτοξικές ενώσεις (Εικόνα 12). Οι περισσότερες δεν δίνουν την μέγιστη θεραπευτική αποτελεσματικότητα λόγω της ελλιπής εκλεκτικότητας τους απέναντι στα φυσιολογικά κύτταρα ή λόγω μηχανισμών αντίστασης των κυττάρων. Για τον λόγο αυτό οι ασθενείς πρέπει να λαμβάνουν υψηλές δόσεις των φαρμάκων το οποίο μπορεί να προκαλέσει παρενέργειες στον οργανισμό και αυξημένη ανθεκτικότητα στα καρκινικά κύτταρα. Για το λόγο αυτό συνδέονται με μόρια στόχευσης ³⁵.



Εικόνα 12: Χημικές δομές κυτταροτοξικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται συχνά στην ανάπτυξη συζευγμάτων με μόρια στόχευσης.

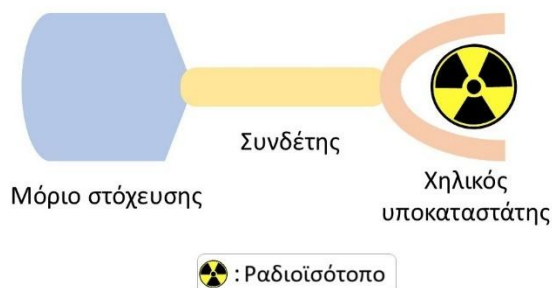
Δυστυχώς οι μέθοδοι θεραπείας, ακόμη και συνδυαστικά, δεν είναι τόσο αποτελεσματικές. Αυτό συμβαίνει αρχικά γιατί ο καρκινικός όγκος έχει ήδη μεγαλώσει αρκετά μέχρι την διάγνωση, οπότε η 100% καταστροφή του δεν είναι εφικτή και τα κύτταρα που επιζούν αρκούν για να συνεχιστεί η καρκινογένεση. Περίπου οι μισοί ασθενείς ακόμα και μετά από χειρουργική επέμβαση δεν θεραπεύονται πλήρως, επειδή τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να έχουν αρχίσει ήδη τις μεταστάσεις σε άλλα σημεία του σώματος και την δημιουργία νέων όγκων μικρού μεγέθους. Τέλος, οι όγκοι χαρακτηρίζονται από ανομοιογένεια, δηλαδή τα κύτταρα μέσα στον ίδιο όγκο μπορεί να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Αυτή η ποικιλία μειώνει την αποτελεσματικότητα των θεραπειών ³⁶.

1.9 Ραδιοφάρμακα και ραδιοθεραπογνώστικα στον καρκίνο

1.9.1 Τι είναι τα ραδιοφάρμακα και τα ραδιοθεραπογνώστικα;

Τα ραδιοφάρμακα είναι μικρά ανόργανα ή οργανικά μόρια τα οποία περιέχουν ένα ραδιοϊσότοπο μετάλλου με κατάλληλες φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες για ασφαλή χορήγηση στον ασθενή. Αυτά μετά την χορήγηση συσσωρεύονται εκλεκτικά σε ένα όργανο ή ιστό του σώματος, όπου παραμένουν για κάποιο χρονικό διάστημα ³⁷. Οι ραδιοφαρμακευτικές ενώσεις μπορούν να προσφέρουν διάγνωση του όγκου μέσω μεθόδων όπως η μαγνητική τομογραφία MRI, η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων συνδυαστικά με αξονική τομογραφία PET/CT και η υπολογιστική τομογραφία μονοφωτονιακής εκπομπής συνδυαστικά με αξονική τομογραφία SPECT/CT ³⁸. Επίσης έχουν την ικανότητα να καταστρέφουν τον όγκο από το εσωτερικό λόγω της βλάβης που προκαλούν στο DNA των καρκινικών κυττάρων σε μικρή απόσταση από την εκπομπή β-σωματιδίων ή ηλεκτρονίων Auger. Σε αυτή την περίπτωση επιθυμητό είναι τα ραδιοϊσότοπα να έχουν μεγάλο χρόνο ημιζωής (από 6 ώρες μέχρι και 10 μέρες) ³⁹. Επιπλέον χρησιμοποιούνται στην στοχευμένη θεραπεία με ραδιοϊσότοπα (Targeted Radionuclide Therapy, RLT), μέθοδος που βασίζεται στην χρήση ραδιοφαρμάκων ⁴⁰. Σε πολλές περιπτώσεις χρησιμοποιούνται μόρια στόχευσης προκειμένου να μεταφερθεί το ραδιοϊσότοπο άμεσα στον όγκο. Και αυτή η οδός θεραπείας έχει μειονεκτήματα όπως είναι η ελάχιστη ποσότητα της ραδιενέργειας που καταλήγει τελικά

στον στόχο μετά από ενδοφλέβια χορήγηση (περίπου 3%) και η τοξικότητα σε κάποια όργανα κατά τη χρήση των ραδιοφαρμάκων (όπως νεφρική τοξικότητα)⁴¹.



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση ενός ραδιοφαρμάκου.

Θεραπευγονωστικά χαρακτηρίζονται τα μόρια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα για τη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου. Όταν τα μόρια αυτά επισημανθούν με ραδιενεργά ισότοπα τότε ονομάζονται “ραδιοθεραπευγονωστικά”. Τέτοια μόρια μπορούν να συνεισφέρουν σε μια πιο εξατομικευμένη, για τον ασθενή, θεραπεία και διάγνωση. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει μεγάλη πρόοδος στον σχεδιασμό και την σύνθεση νέων ραδιοθεραπευγονωστικών μορίων με βελτιωμένη σταθερότητα *in vivo* και καλύτερες φαρμακοκινητικές ιδιότητες^{42,43}.

1.9.2 Τα ραδιοϊσότοπα μετάλλων στην διάγνωση και θεραπεία

Σημαντικό ρόλο στην λειτουργία των ραδιοφαρμάκων και ραδιοθεραπευγονωστικών παίζουν και τα ραδιοϊσότοπα διάφορων μετάλλων. Ανάλογα με την επιλογή του στοιχείου μπορεί να επιτευχθεί είτε οπτική απεικόνιση του όγκου είτε αντιμετώπιση του⁴⁴. Από τα περίπου 1200 ραδιοϊσότοπα, ελάχιστα χρησιμοποιούνται στην επιστημονική και ιατρική έρευνα. Αυτό συμβαίνει γιατί δεν έχουν όλα τον απαραίτητο χρόνο ημιζωής (ο χρόνος που χρειάζεται για να διασπαστούν τα μισά ραδιονουκλίδια), κατάλληλο τρόπο διάσπασης και κατάλληλη ενέργεια ακτινοβολίας⁴⁵.

Τα ραδιοϊσότοπα παράγονται με τέσσερις μεθόδους⁴⁶:

- *Πυρηνική σχάση.* Γίνεται διάσπαση, είτε αυθόρμητα είτε με εφαρμογή ενέργειας, των ατομικών πυρήνων σε μικρότερους.
- *Αντιδράσεις νετρονίων.* Τα ραδιοϊσότοπα παράγονται μέσω διεργασιών ενεργοποίησης με νετρόνια ή μεταστοιχείωσης (μεταστοιχείωση είναι η μετατροπή ενός ισότοπου σε ένα άλλο στοιχείο). Ειδικά υλικά βομβαρδίζονται με νετρόνια στο εσωτερικό ενός πυρηνικού αντιδραστήρα, οδηγώντας στον σχηματισμό πολλών ραδιοϊσοτόπων.
- *Μέσω κύκλωτρων.* Τα κύκλωτρα χρησιμοποιούνται στην επιτάχυνση φορτισμένων σωματιδίων και σύγκρουση με άλλα στοιχεία για την δημιουργία ισότοπων.
- *Γεννήτριες ισότοπων.* Γεννήτριες $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$

Ακολουθούν παραδείγματα από τα ραδιοϊσότοπα μετάλλων (Πίνακας 7) αλλά και αμέταλλων στοιχείων (Πίνακας 8) που έχουν χρησιμοποιηθεί σε ραδιοφάρμακα και ραδιοθεραπευγονωστικά μόρια.

Πίνακας 7: Παραδείγματα ραδιοϊσοτόπων μετάλλων που χρησιμοποιούνται στην διάγνωση και θεραπεία ⁴³.

Ραδιοϊσότοπο μέταλλου	Μέθοδος απεικόνισης	Τρόπος θεραπείας	Ακτινοβολία
Τεχνήτιο-99m	SPECT	-	γ
Γάλλιο-68	PET	-	β^+
Ακτίνιο-225	-	Με α -σωματίδια	α
Ύτριο-90	-	Με β -σωματίδια	β^-
Γάλλιο-67	-	Ηλεκτρόνια Auger	γ , Auger e^-
Χαλκός-67	SPECT	Με β -σωματίδια	γ , β^-
Ίνδιο-111	SPECT	Με Ηλεκτρόνια Auger	γ , Auger e^-

Πίνακας 8: Παραδείγματα ραδιοϊσοτόπων αμετάλλων που χρησιμοποιούνται στην διάγνωση και θεραπεία ⁴³.

Ραδιοϊσότοπο αμετάλλου	Μέθοδος απεικόνισης	Μέθοδος θεραπείας	Ακτινοβολία
Ιώδιο-123	SPECT	-	γ
Φθόριο-18	PET	-	β^+
Άζωτο-13	PET	-	β^+
Φωσφόρος-32	-	Με β -σωματίδια	β^-
Βρώμιο-77	-	Με Ηλεκτρόνια Auger	Auger e^-
Ιώδιο-131	SPECT	Με β -σωματίδια	γ , β^-

Μία υποκατηγορία των μετάλλων είναι η ομάδα των λανθανίδων (γνωστά και ως σπάνιες γαίες με την προσθήκη του Ύτριου και Σκανδίου). Είναι τα στοιχεία με ατομικό αριθμό 57 μέχρι 71. Παρόλο που κανένα από αυτά δεν είναι απαραίτητο για τον ανθρώπινο οργανισμό, οι βιοχημικές επιδράσεις τους βρίσκουν χρήση στην ιατρική. Τα ραδιοϊσότοπα των λανθανίδων και τα σύμπλοκά τους με χηλικούς υποκαταστάτες χρησιμοποιούνται στην διάγνωση του καρκίνου μέσω μεθόδων απεικόνισης (MRI, PET, SPECT) αλλά και φθορισμού καθώς κάποια από τα στοιχεία έχουν φωτοφυσικές ιδιότητες. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και για θεραπεία καθώς εκπέμπουν β -σωματίδια, ηλεκτρόνια Auger και είναι πιθανοί φωτοευαισθητοποιητές (PhotoSensitizers, PSs) για φωτοδυναμική θεραπεία (PhotoDynamic Therapy, PDT). Ο χρόνος ημιζωής, η σταθερή τρισθενής μορφή (Ln^{3+}) και οι ικανότητες των λανθανίδων για θεραπεία και διάγνωση τα κάνουν κατάλληλα μέταλλα για σχεδιασμό και σύνθεση νέων ραδιοθεραπευτικών μορίων ^{44,47}.

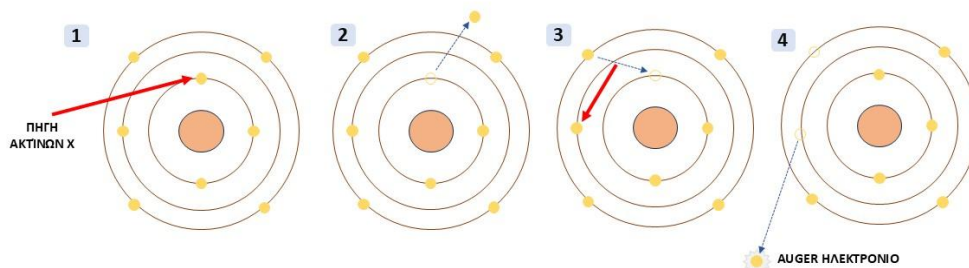
Πιο συγκεκριμένα, τα μέταλλα που θα μας απασχολήσουν στην παρούσα εργασία είναι τα εξής:

- *Γαδολίνιο (Gadolinium, Gd)*. Χρησιμοποιείται κυρίως ως σκιαγραφικό υλικό στις απεικονίσεις με MRI ⁴⁸.
- *Νεοδύμιο (Neodymium, Nd)*. Χρησιμοποιείται σε μεγάλο ποσοστό για τις φωτοφυσικές του ιδιότητες ^{49,50}.
- *Ευρώπιο (Europium, Eu)*. Ομοίως με το Νεοδύμιο, και αυτό χρησιμοποιείται για απεικόνιση μέσω φθορισμού ⁵¹.

- **Τέρβιο (Terbium, Tb).** Το ^{161}Tb έχει θεραπευτική χρήση μέσω της εκπομπής β-σωματιδίων (μέση ενέργεια $E_{\beta} \sim 154 \text{ keV}$) και ηλεκτρονίων Auger ⁵². Επιπλέον, η εκπομπή γ-ακτινοβολίας (17% $E_{\beta} \sim 49 \text{ keV}$ και 10% $E_{\beta} \sim 75 \text{ keV}$) αλλά και ο χρόνος ημιζωής των 6.89 ημερών το καθιστά χρήσιμο ραδιομέταλλο στην απεικόνιση μέσω SPECT ⁵³.
- **Λουτέσιο (Lutetium, Lu).** Το ^{177}Lu βρίσκει χρήση στην θεραπεία των καρκινικών όγκων (π.χ. Lu-177-DOTATATE, Lu-177-PSMA) με την εκπομπή β-σωματιδίων ($E_{\beta} \sim 497 \text{ keV}$) ⁴⁴. Με χρόνο ημιζωής 6.65 μέρες και εκπομπή χαμηλής ενέργειας γ-ακτινοβολίας ($E_{\beta} \sim 113 \text{ keV}$ και $E_{\beta} \sim 208 \text{ keV}$) προσφέρει δυνατότητα απεικόνισης με SPECT ^{54,55}.
- **Γάλλιο (Gallium, Ga).** Αν και το Γάλλιο δεν ανήκει στην ομάδα των λανθανίδων, η ευρεία χρήση του στην απεικόνιση μέσω PET (^{68}Ga) με την εκπομπή ποζιτρονίων με $E_{\beta} \sim 836 \text{ keV}$ και χρόνο ημιζωής 68 λεπτά (π.χ. Ga-68-DOTATATE, Ga-68-PSMA) ^{56,57}. Επιπλέον, η πιθανή θεραπευτική του δράση με εκπομπή ηλεκτρονίων Auger (^{67}Ga) το καθιστά ως ένα πολλά υποσχόμενο ραδιοθεραπευτικό μόριο ⁴³. Το ^{68}Ga εκπέμπει και χαμηλής ενέργειας γ-ακτινοβολία με $E_{\beta} \sim 511 \text{ keV}$ ^{56,57}.
- **Τεχνήτιο (Technetium, Tc).** Το Τεχνήτιο $^{99\text{m}}\text{Tc}$ έχει χρόνο ημιζωής 6 ώρες. Εκπέμπει ακτινοβολία γ με $E_{\beta} \sim 140 \text{ keV}$, ιδανική για απεικόνιση SPECT. Χρησιμοποιείται στην απεικόνιση του εγκεφάλου (π.χ. Tc-99m-HMPAO), όπως και της καρδιάς, των οστών και των νεφρών. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό που το κάνει το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο ραδιοϊσότοπο στη διάγνωση είναι η εύκολη διαθεσιμότητά του από γεννήτριες $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ ^{58,59}.

1.9.3 Θεραπεία με ηλεκτρόνια Auger

Τα ηλεκτρόνια Auger (Auger electrons, AEs) είναι ηλεκτρόνια χαμηλής ενέργειας που εκπέμπονται από ραδιοϊσότοπα που διασπώνται μετά από ακτινοβολήση. Η ενέργεια αυτή μπορεί να μεταφερθεί σε γειτονικά καρκινικά κύτταρα σε απόσταση νανομέτρων - μικρομέτρων (υψηλή γραμμική μεταφορά ενέργειας), με αποτέλεσμα την καταστροφή τους. Η εκπομπή ηλεκτρονίων Auger ξεκινάει με την ακτινοβολήση του ραδιοϊσοτόπου με ακτίνες Χ ή φορτισμένα σωματίδια (βήμα 1). Ένα ηλεκτρόνιο σε εσωτερική στοιβάδα απομακρύνεται λόγω της απορρόφησης της ενέργειας (βήμα 2). Ηλεκτρόνιο εξωτερικής στοιβάδας μετακινείται στην θέση του και απελευθερώνεται ενέργεια η οποία δεν εκπέμπεται σαν φωτόνιο αλλά μεταφέρεται σε άλλο ηλεκτρόνιο του ατόμου (βήμα 3). Αυτό με την σειρά του εκτινάσσεται από το άτομο και είναι το ηλεκτρόνιο Auger (βήμα 4) ⁶⁰.

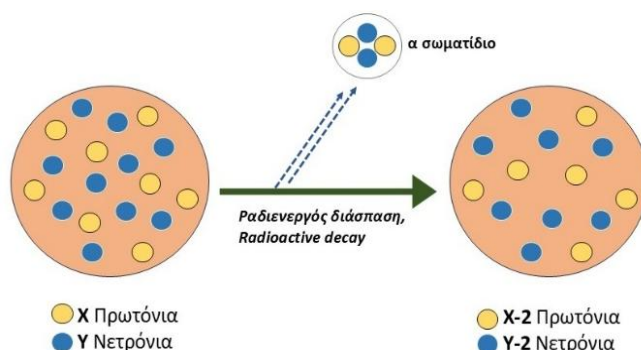


Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση της εκπομπής ηλεκτρονίων Auger.

1.9.4 Θεραπεία με σωματίδια α

Τα σωματίδια α (alpha particles) παράγονται κατά την ραδιενεργό διάσπαση α (α decay, alpha decay) ενός πυρήνα ο οποίος μετατρέπεται σε πυρήνα με δυο πρωτόνια και 2

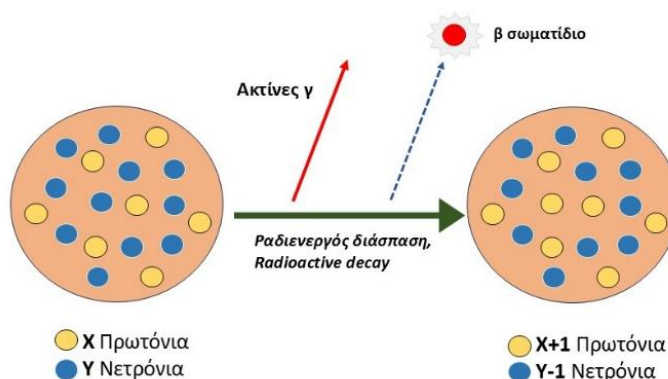
νετρόνια λιγότερα. Αυτά εκπέμπονται ως σωματίδιο α, δηλαδή έναν πυρήνα ηλίου-4 (^4He), και έχουν τεράστια γραμμική μεταφορά ενέργειας (Linear Energy Transfer, LET) καταστρέφοντας τα πολύ κοντινά κύτταρα (απόσταση λίγων δεκάδων μικρομέτρων) διασπώντας απευθείας την διπλή έλικα του DNA ⁶¹.



Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση της εκπομπής σωματιδίων α.

1.9.5 Θεραπεία με σωματίδια β

Τα σωματίδια β (beta particles) είναι υψηλής ενέργειας και ταχύτητας ηλεκτρόνια που εκπέμπονται κατά την ραδιενεργό διάσπαση β (β decay, beta decay) όπου ο ασταθής πυρήνας ενός στοιχείου μετατρέπεται σε έναν πιο σταθερό με μετατροπή ενός νετρονίου σε ηλεκτρόνιο και πρωτόνιο. Μαζί με το σωματίδιο β εκπέμπονται και ακτίνες γ. Τα σωματίδια β, όπως και τα ηλεκτρόνια Auger προκαλούν βλάβες στα γειτονικά καρκινικά κύτταρα καταστρέφοντάς τα (όχι τόσο ισχυρά όσο τα α σωματίδια) ⁶².



Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση της εκπομπής σωματιδίων β.

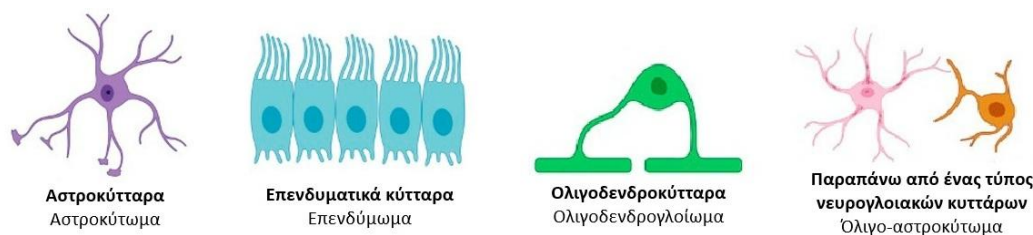
1.10 Το γλοίωμα: οι μορφές του, η διάγνωση και η θεραπεία

1.10.1 Το γλοίωμα

Γλοίωμα (Glioma) ονομάζεται ο καρκίνος που σχηματίζεται στον εγκέφαλο και στον νωτιαίο μυελό στα νευρογλοιακά κύτταρα τα οποία είναι υπεύθυνα για την προστασία των νευρικών κυττάρων στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Το γλοίωμα χαρακτηρίζεται από πολύ γρήγορους ρυθμούς ανάπτυξης, διάχυτη εγκεφαλική εξάπλωση (διάχυτο γλοίωμα) και φτωχή πρόγνωση. Είναι όγκοι με μεγάλη αντοχή στις θεραπείες λόγω της ετερογένειας τους, του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Blood-Brain Barrier, BBB) που περιορίζει δραματικά την

είσοδο των φαρμάκων στον εγκέφαλο μετά την χορήγηση και του μικροπεριβάλλοντος στο οποίο οι αντιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος καταστέλλονται ⁶³.

Τα γλοιώματα κατατάσσονται σε τέσσερις βασικές κατηγορίες με βάση τα κύτταρα από τα οποία προέρχονται. Αυτές είναι τα αστροκύτωμα, ολιγοδενδρογλοίωμα, επενδύμωμα και όλιγο-αστροκύτωμα. Περαιτέρω ταξινόμηση μπορεί να γίνει σε χαμηλού βαθμού (low-grade), υψηλού βαθμού (high-grade) ή άτυπα-αναπλαστικά γλοιώματα με βάση την μιτωτική δραστηριότητα (δηλαδή τον αριθμό των κυττάρων που υφίστανται μίτωση σε σχέση με τον συνολικό αριθμό), την μορφολογία των κυττάρων και τους μοριακούς δείκτες ⁶⁴.



Εικόνα 17: Τα νευρογλοιακά κύτταρα και οι τύποι γλοιώματος που προκύπτουν ⁶⁴.

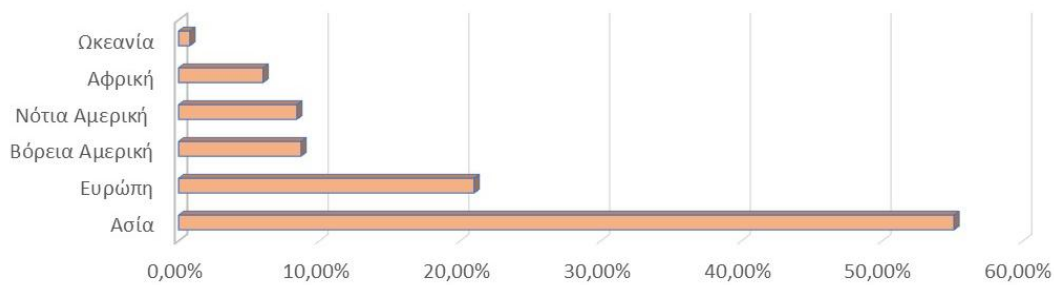
Ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας (ΠΟΥ, WHO) το 2016 ανακοίνωσε την “Ταξινόμηση όγκων του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος”, ένα διεθνές πρότυπο για την ονοματολογία και τη διάγνωση του γλοιώματος. Περιλαμβάνει την ταξινόμηση των όγκων βασισμένη αποκλειστικά σε ιστολογικά χαρακτηριστικά και ορισμένους μοριακούς βιοδείκτες (γονίδια, πρωτεΐνες, μεταλλάξεις ή άλλα βιολογικά σημάδια που παρατηρούνται στα κύτταρα και παρέχουν πληροφορίες για τον τύπο και την προέλευση του καρκίνου, την διάγνωσή του και την ανταπόκριση στην θεραπεία). Το 2021 ο ΠΟΥ χρησιμοποίησε για πρώτη φορά μοριακούς βιοδείκτες ως μέτρο ταξινόμηση των γλοιωμάτων στο νέο πρότυπο έδωσε μεγαλύτερη έμφαση σε αυτούς. Οι κύριοι βιοδείκτες του γλοιώματος είναι η Ισοκιτρική Αφυδρογονάση (Isocitrate Dehydrogenase, IDH), η συν-διαγραφή των χρωμοσωμικών περιοχών 1p και 19q (1p/19q co-deletion), η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 (Tumor Protein p53, TP53), ο Υποδοχέας Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR), η Αντίστροφη Μεταγραφάση της Τελομεράσης (Telomerase Reverse Transcriptase, TERT), η O⁶-μεθυλογουανίνη-DNA μεθυλτρανσφεράση (O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT), οι μεταβολές του H3F3A γονιδίου της ιστόνης H3.3, η συνδυαστική απόκτηση χρωμοσώματος 7 - απώλεια του χρωμοσώματος 10 (7+/10-), και η πρωτεΐνη συνδεδεμένη με το Σύνδρομο Άλφα-Θαλασσαιμίας / Πνευματικής Καθυστέρησης συνδεόμενο με το Χ-χρωμόσωμα (Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-linked, ATRX) ^{65,66}. Ο ρόλος του καθενός περιγράφεται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Ο ρόλος των βιοδείκτων που συνδέονται με το γλοίωμα ^{65,67,68}.

Βιοδείκτης	Ρόλος
IDH	Οι μεταλλάξεις στην IDH χαρακτηρίζουν τα low-grade γλοιώματα σε ενήλικες και βοηθάνε στην καλύτερη πρόγνωση του είδους το καρκίνου.
1p/19q co-deletion	Low-grade γλοιώματα με μετάλλαξη IDH και συν-διαγραφή των χρωμοσωμικών περιοχών 1p και 19q (που εμφανίζονται στα ολιγοδενδρογλοιώματα) έχουν καλύτερη ανταπόκριση στην

	ακτινοθεραπεία-χημειοθεραπεία και σχετίζονται με μεγαλύτερο χρόνο επιβίωσης.
TP53	Η πρωτεΐνη p53 ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση και την επιδιόρθωση του DNA. Η μετάλλαξη του TP53 οδηγεί σε απώλεια αυτών των λειτουργιών, επιτρέποντας την ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση και την ανάπτυξη όγκων. Αποτέλεσμα είναι η επιθετική συμπεριφορά του όγκου, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει την διάγνωση και την θεραπεία.
ATRX	Η απώλεια της πρωτεΐνης ATRX και/ή η διάχυτη ανοσοθετικότητα της p53 είναι ενδεικτική αστροκυττώματος και αποκλείει την παρουσία 1p/19q συν-διαγραφής.
MGMT	Ο προαγωγέας MGMT είναι μεθυλιωμένος περίπου στο 45% των ασθενών με γλοίωμα. Αυτό επιφέρει καλύτερη ανταπόκριση στο φάρμακο Τεμοζολομίδη (Temozolomide, Temodal, TMZ).
TERT	Οι μεταλλάξεις στον προαγωγέα TERT και η αυξημένη έκφρασή του επιτρέποντας την κυτταρική αθανασία. Μεταλλάξεις του προαγωγέα TERT παρατηρήθηκαν σε όλα σχεδόν τα γλοιώματα ενώ περίπου το 70% των πρωτογενών γλοιοβλαστωμάτων στους ενήλικες έχουν τέτοιες μεταλλάξεις.
EGFR	Η ενίσχυση αλλά και οι μεταλλάξεις του EGFR μπορεί να αντιπροσωπεύουν εξελικτικά γεγονότα που οδηγούν την επιθετική φύση του γλοιοβλαστώματος προάγοντας την εισβολή και την αγγειογένεση μέσω διακριτών μονοπατιών σηματοδότησης.
H3F34 (H3 K27, H3 G34)	Οι μεταλλάξεις στο H3F3A επηρεάζουν τα αμινοξέα K27 και G34 της H3.3, στο 33% των γλοιωμάτων στα παιδιά. Η ανίχνευση με H3 K27 και με H3 G34 μεταλλάξεων υποδεικνύουν υψηλού βαθμού γλοίωμα.
7+/10-	Η απόκτηση (ενός ή παραπάνω) χρωμοσώματος 7 συσχετίστηκε με υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής του όγκου. Η μερική ή ολική απώλεια του χρωμοσώματος 10 μειώνει το προσδόκιμο επιβίωσης του ασθενή. Η χρωμοσωμική αλλαγή 7+/10- είναι χαρακτηριστικό του γλοιοβλαστώματος IDH-άγριου τύπου.

Σχετικά με περιστατικά καρκίνου του εγκεφάλου και ΚΝΣ, το 2022 υπήρχαν περίπου 320.000 νέες περιπτώσεις και ο αριθμός θανάτων έφτασε στις 250.000 παγκοσμίως. Μεγαλύτερος αριθμός περιστατικών υπήρχαν στην Ασία και αμέσως μετά στην Ευρώπη. Τα ποσοστά οφείλονται στο μέγεθος του πληθυσμού αλλά και στην οικονομική κατάσταση κάθε χώρας, καθώς πιο προχωρημένοι και πιο εξειδικευμένοι τρόποι διάγνωσης και θεραπείας απαιτούν και περισσότερους οικονομικούς πόρους ⁶⁹.

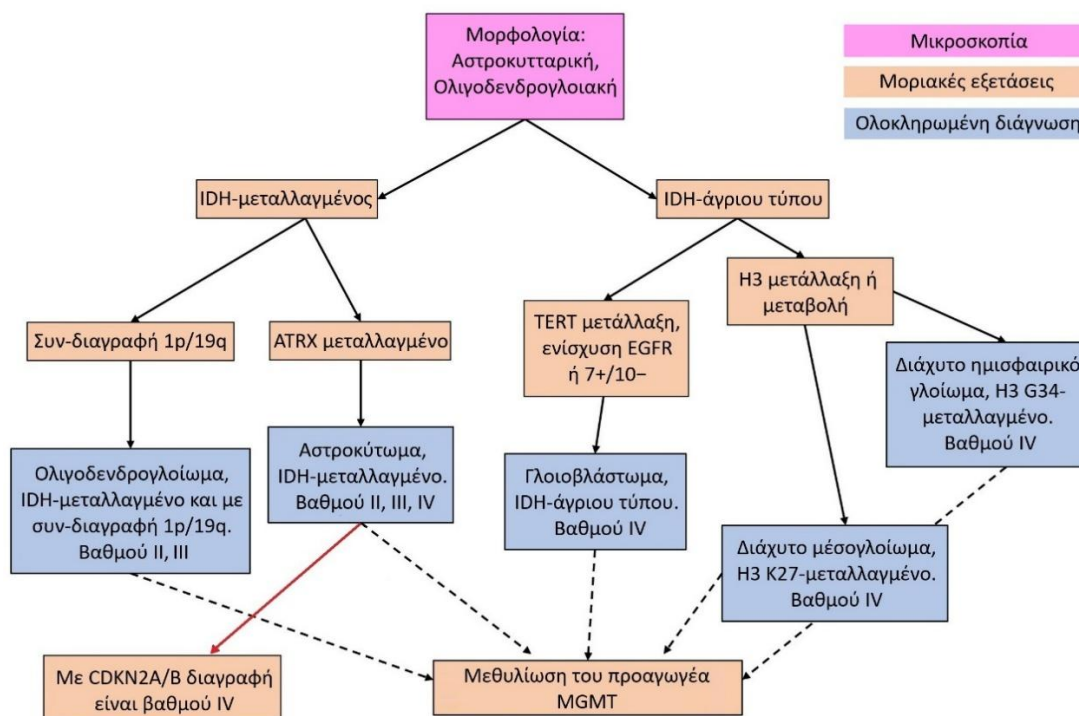


Εικόνα 18: Ποσοστά περιστατικών εμφάνισης γλοιώματος ανά ήπειρο ⁶⁹.

Το γλοιοβλάστωμα ή πολύμορφο γλοιοβλάστωμα (Glioblastoma Multiforme, GBM) είναι επιθετικός κακοήθης όγκος του εγκεφάλου (IDH-άγριου τύπου γλοίωμα). Προέρχεται από τα αστροκύτταρα και χαρακτηρίζεται από ραγδαία ανάπτυξη και εισχώρηση στον εγκέφαλο, δυσκολεύοντας αρκετά την αφαίρεσή του. Δυστυχώς ο μέσος χρόνος επιβίωσης του ασθενή μετά την διάγνωση με γλοιοβλάστωμα είναι 12-15 μήνες ακόμα και μετά από ραδιοθεραπεία, χορήγηση τεμοζολομίδης (Temozolomide, TMZ) και/ή χειρουργική επέμβαση, ενώ ένα μικρό ποσοστό κάτω του 5% έχει χρόνο ζωής πάνω από τρία χρόνια ^{70,71}.

1.10.2 Διάγνωση και θεραπεία

Είναι σαφές πλέον ότι η διάγνωση κάποιου ασθενή με γλοίωμα πρέπει να γίνεται σε πρώιμο στάδιο. Για την διάγνωση του γλοιώματος οι γιατροί βασίζονται στο πλήρες ιατρικό ιστορικό του ασθενή σε συνδυασμό με πλήρη νευρολογική εξέταση και απεικονίσεις του εγκεφάλου με MRI, PET, SPECT μετά από χορήγηση σκιαγραφικού υλικού ⁷². Στην συνέχεια με βιοψία αφαιρείται μικρό τμήμα ιστού για περαιτέρω εργαστηριακή εξέταση, όπου και γίνεται εκτίμηση μέσω ανοσοϊστοχημείας. Η ανοσοϊστοχημεία (immunohistochemistry, IHC) είναι εργαστηριακή τεχνική που χρησιμοποιεί αντισώματα για την ανίχνευση αντιγόνων σε ένα τμήμα ιστού. Τα διάχυτα γλοιώματα μπορούν συνήθως να χαρακτηριστούν με αστροκυτταρική ή ολιγοδενδρογλοιακή μορφολογία. Μετά από μοριακές εξετάσεις τα γλοιώματα κατηγοριοποιούνται σε όγκους IDH- μεταλλαγμένους ή IDH τύπου. Τέλος, ακολουθεί η ολοκληρωμένη διάγνωση και προσαρμόζεται η μέθοδος θεραπείας ^{73,74}.



Εικόνα 19: Σχηματική αναπαράσταση που παρουσιάζει τη διαγνωστική διαδικασία για τη διάγνωση γλοιωμάτων σε ενήλικες. Τα πορτοκαλί ορθογώνια παρουσιάζουν μοριακές δοκιμές που χρησιμοποιούνται για διάγνωση και πρόγνωση, οι συμπαγείς γραμμές υποδεικνύουν διαγνωστική χρήση, η κόκκινη γραμμή υποδεικνύει τις εξετάσεις που χρησιμοποιούνται στην πρόγνωση/βαθμολόγηση, οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν εξετάσεις που χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία και τέλος, τα μπλε ορθογώνια υποδεικνύουν διαγνώσεις όπως ορίζονται στην "Ταξινόμηση όγκων του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος" του ΠΟΥ 2021 ⁷³.

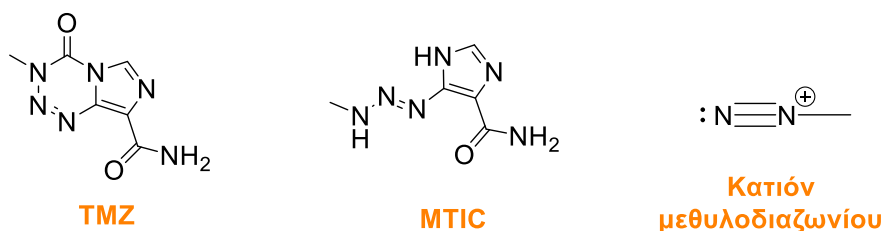
Η βασική θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών με γλοίωμα είναι η χειρουργική επέμβαση στην οποία γίνεται αφαίρεση του όγκου μέχρι τον βαθμό που είναι εφικτό. Στις περιπτώσεις που η τοποθεσία του όγκου είναι δυσπρόσιτη, η χειρουργική επέμβαση μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα ή να μην γίνει πλήρης αφαίρεση του όγκου, γίνονται συμπληρωματικές θεραπείες όπως η ακτινοθεραπεία, στην οποία χρησιμοποιείται ιονίζουσα ακτινοβολία για την καταστροφή τα καρκινικών κυττάρων και η χημειοθεραπεία στην οποία χρησιμοποιούνται αντικαρκινικά φάρμακα για την θανάτωση και αναστολή πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Τα πιο συχνά φάρμακα είναι η TMZ με χρήση στο γλοιοβλάστωμα και τα IDH-μεταλλαγμένα γλοιώματα, και το σύμπλεγμα φαρμάκων Προκαρβαζίνη-Λομουστίνη-Βινκριστίνη (Procarbazine-Lomustine-Vincristine, PCV) ⁷². Επιπλέον, ο ασθενής μπορεί να υποβληθεί σε σύγχρονες τεχνικές όπως τα Πεδία Θεραπείας Όγκων (Tumor Treating Fields, TTF, γίνεται χρήση ηλεκτρικών πεδίων χαμηλής ενέργειας για να διαταραχθεί η ικανότητα ανάπτυξης και διαίρεσης καρκινικών κυττάρων) και η Διάμεση Θερμική Θεραπεία με Λέιζερ (Laser Interstitial Thermal Therapy, LITT, εμφυτεύεται ένας καθετήρας λέιζερ στον όγκο ο οποίος θερμαίνεται σε θερμοκρασίες αρκετά υψηλές για την καταστροφή του όγκου) ⁷³.

Παρά την τεχνολογική και φαρμακολογική πρόοδο των τελευταίων ετών ο χρόνος επιβίωσης των ασθενών με γλοίωμα δεν έχει αλλάξει. Η ανάγκη για στόχευση και θεραπεία των καρκινικών κυττάρων στην περιοχή διήθησης χωρίς να προκληθεί βλάβη στον

περιβάλλοντα εγκεφαλικό ιστό παραμένει μεγάλη. Ο συνδυασμός χειρουργικής επέμβασης - χημειοθεραπείας αν και πολλά υποσχόμενος, περιορίζεται από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ο οποίος περιορίζει την δράση των φαρμάκων. Για τον λόγο αυτό πολλές έρευνες έχουν στραφεί στον συνδυασμό θεραπείας με ραδιοϊσότοπα – συμπληρωματική ακτινοθεραπεία με την χορήγηση ραδιοφαρμάκων ⁷⁵.

1.10.3 Ο ρόλος της Τεμοζολομίδης

Η Τεμοζολομίδα (Temodal) είναι φάρμακο που χρησιμοποιείται στην χημειοθεραπεία κατά του γλοιοβλαστώματος και του αναπλαστικού αστροκυτώματος. Το 2005 ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (United States Food and Drug Administration, USFDA) έδωσε έγκριση στην χρήση του ως παράγοντας αλκυλίωσης του DNA. USFDA χορήγησε έγκριση στην TMZ, που επίσης αναγνωρίζεται με την επωνυμία Temodal, το 2005 ως παράγοντας αλκυλίωσης DNA δεύτερης γενιάς ⁷⁶. Η TMZ είναι ένα παράγωγο ιμιδαζοτετραζίνης του αλκυλιωτικού παράγοντα δακαρβαζίνη που χρησιμοποιείται κατά των κακοηθειών του κεντρικού νευρικού συστήματος. Σε pH>7 μετατρέπεται μέσω υδρόλυσης στον δραστικό μεταβολίτη 5-(3-μεθυλ1-τριαζενο)ιμιδαζολο-4-καρβοξαμίδιο [5-(3-methyl-1-triazeno) imidazole-4-carboxamide, MTIC]. Έχει υψηλή διείσδυση στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Ο τρόπος δράσης του είναι μέσω παρεμβολής στην αντιγραφή του DNA. Αυτό συμβαίνει λόγω μεθυλίωσής με το σχηματισμό δραστικού κατιόντος το οποίο αλληλοεπιδρά σε τρία σημεία της διπλής έλικας: N7-Γουανίνη (7%), N3-Αδενίνη (9,2%) και O6-Γουανίνη (5%). Η κυτταροτοξικότητά εξαρτάται από τον βαθμό δραστικότητας τριών ενζυμικών συστημάτων επιδιόρθωσης του DNA: της O6-αλκυλγουανίνη-DNA-αλκυλτρανσφεράσης (AGT), της επιδιόρθωσης αναντιστοιχίας του DNA (DNA mismatch repair), και της πολυ(ADP-ριβόζη) πολυμεράσης ⁷⁷.



Εικόνα 20: Οι δομές της Τεμοζολομίδης, του δραστικού μεταβολίτη της MTIC και του παράγοντα μεθυλίωσης.

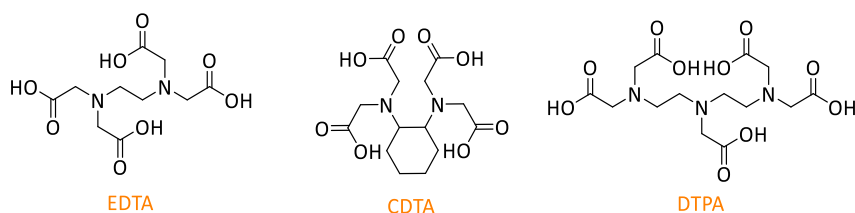
1.11 Χηλικοί υποκαταστάτες

Χηλικός υποκαταστάτης ή χηλικός παράγοντας είναι οργανικά μόρια που έχουν την ικανότητα να δεσμεύσουν ιόντα μετάλλων με δημιουργία δύο ή περισσότερων δεσμών με αυτό ⁷⁸. Τέτοια μόρια έχουν εφαρμογή σε περιβαλλοντικές εφαρμογές όπως η απομάκρυνση βαρέων μετάλλων από το έδαφος, το νερό και τα βιομηχανικά απόβλητα. Επίσης χρησιμοποιούνται και σε καθαριστικά προϊόντα στην βιομηχανία αλλά και σε λιπάσματα. Η πιο σημαντική εφαρμογή είναι στην ιατρική. Χηλικοί παράγοντες συμμετέχουν στην αντιμετώπιση δηλητηριάσεων από βαρέα μέταλλα και στην απεικόνιση και θεραπεία. Υπάρχουν διάφοροι χηλικοί υποκαταστάτες που χρησιμοποιούνται στην ιατρική και διαφέρουν στην δομή, στο μέταλλο που δεσμεύουν καλύτερα και στην σταθερότητα του

τελικού συμπλόκου. Κατηγοριοποίηση αυτών μπορεί να γίνει με βάση την δομή τους, σε μη-κυκλικούς και μακροκυκλικούς ⁷⁹⁻⁸¹.

1.11.1 Μη-κυκλικοί χηλικοί υποκαταστάτες

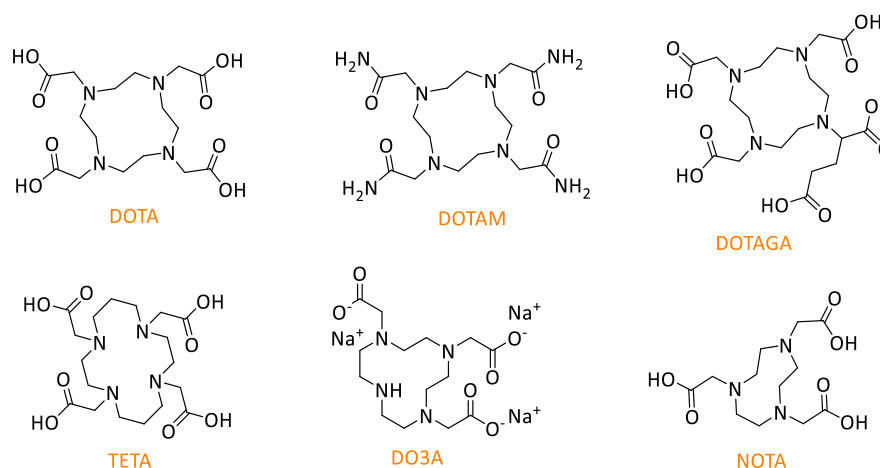
Ο σχεδιασμός μη-κυκλικών χηλικών υποκαταστατών βασίστηκε στο Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) και ανάλογά του (όπως το CDTA) για την δέσμευση μετάλλων αλλά η χαμηλή *in vivo* σταθερότητα κατεύθυνε την έρευνα προς τα ανάλογα του DTPA ^{82,83}. Αυτά έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό ως ραδιοφάρμακα, όμως το φαινόμενο της τρανσχηλίωσης, δηλαδή αλλαγή του δεσμευμένου μετάλλου από άλλο μέταλλο ή μικρό οργανικό μόριο, έχει ωθήσει τους ερευνητές προς τους κυκλικούς χηλικούς παράγοντες ⁸⁴.



Εικόνα 21: Δομές μη-κυκλικών χηλικών υποκαταστατών ⁸³.

1.11.2 Κυκλικοί χηλικοί υποκαταστάτες

Οι κυκλικοί χηλικοί υποκαταστάτες έχουν την τάση να σχηματίζουν κινητικά αδρανή σύμπλοκα με τα ραδιομέταλλα υψηλής σταθερότητας ⁸⁵. Οι υποκαταστάτες που περιέχουν και μία ομάδα για περαιτέρω χημικές αντιδράσεις ονομάζονται διλειτουργικοί χηλικοί παράγοντες (bifunctional chelating agents, BFCs). Ο πιο γνωστός διλειτουργικός χηλικός παράγοντας είναι το 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-τετρααζακυκλοδωδεκανο-1,4,7,10-τετραυλ)τετραοξικό οξύ (γνωστό και ως Tetraxetan ή DOTA). Μια καρβοξυλομάδα χρησιμοποιείται για σύνδεση με κάποιο φορέα ή οργανικό μόριο στόχευσης ενώ οι άλλες τρεις για την δέσμευση του ραδιομετάλλου. Το DOTA μπορεί να συμπλοκοποιηθεί (επισημανθεί) με μεγάλο εύρος τρισθενών μετάλλων. Επιπλέον, τα καρβοξυλικά οξέα κάνουν το ραδιοφάρμακο εξαιρετικά υδρόφιλο, γεγονός που ευνοεί την απομάκρυνσή του από το αίμα, το ήπαρ και τα νεφρά. Αποτρέπεται επίσης η *in vivo* διάσπαση σε όξινο περιβάλλον του συμπλόκου λόγω των χαμηλών τιμών pK_a των ομάδων αυτών. Τα πλεονεκτήματα αυτά οδήγησαν στην σύνθεση αναλόγων του DOTA, όπως τα DOTAM, DOTAGA, NOTA, TETA και DO3A ^{83,86}.

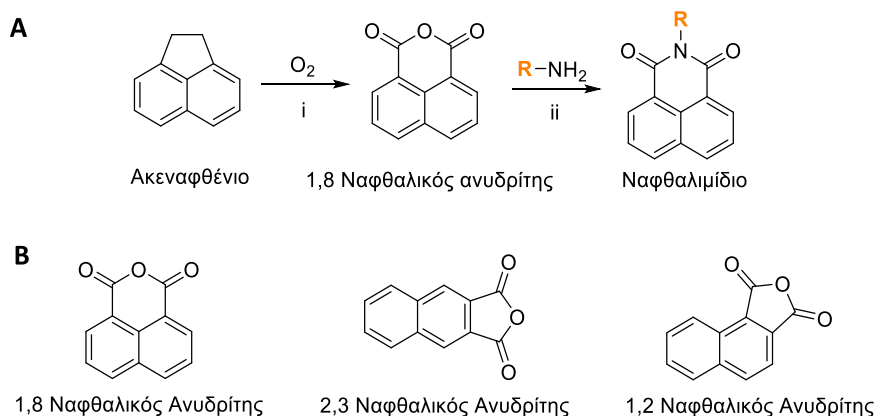


Εικόνα 22: Δομές κυκλικών χηλικών υποκαταστατών ^{83,87-89}.

Λόγω της εξαιρετικής σταθερότητας με τρισθενή μέταλλα επιλέχθηκε ο χηλικός υποκαταστάτης DOTA για την επισήμανση με τα επιλεγμένα μέταλλα (ψυχρά και ραδιενεργά) ⁹⁰. Για την επισήμανση του υποκαταστάτη DOTA χρειάζεται θέρμανση για κάποιο χρονικό διάστημα (καθώς σε θερμοκρασία δωματίου η αντίδραση είναι πραγματοποιείται με μικρό ρυθμό). Χρειάζεται επίσης το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution) και την ρύθμιση του pH. Το σημαντικότερο είναι η υψηλή καθαρότητα του μετάλλου αλλά και η απουσία ξένων στοιχείων από το διάλυμα της αντίδρασης, που θα μπορούσαν να συμπλοκοποιηθούν με το DOTA ⁸³.

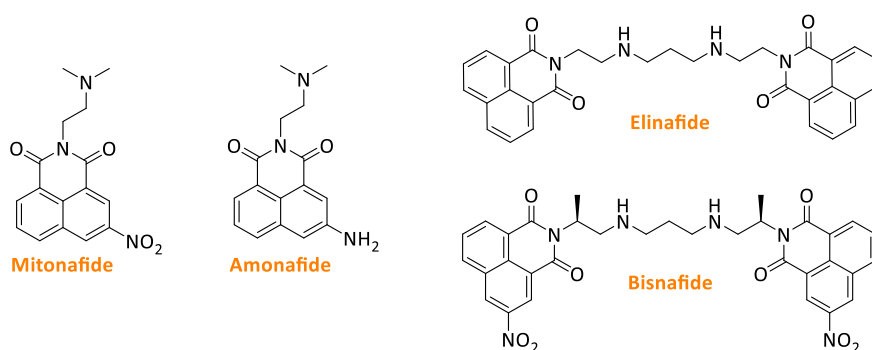
1.12 Τα 1,8-ναφθαλιμίδια στον καρκίνο

Τα 1,8-ναφθαλιμίδια είναι οργανικές αρωματικές ενώσεις που προέρχονται από το 1,8-ισομερές του ναφθαλικού ανυδρίτη, ο οποίος με την σειρά του προκύπτει με οξείδωση του ακεναφθένιου. Είναι ενώσεις παρόμοιες με το ναφθαλένιο και μοιράζονται κάποια χαρακτηριστικά με την οικογένεια των κυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs). Είναι δηλαδή άπολες ενώσεις, έχουν επίπεδη γεωμετρία και είναι άχρωμα στερεά ^{91,92}.



Εικόνα 23: (Α) Αντιδράσεις σχηματισμού του 1,8-ναφθαλιμιδίου με i) οξείδωση και ii) σχηματισμό ιμιδίου, (Β) Ισομερή του ναφθαλικού ανυδρίτη.

Τα ανάλογα του υποκατεστημένου-1,8-ναφθαλιμιδίου βρίσκουν χρήση στην σύνθεση ενώσεων που διαθέτουν φωτοφυσικές ιδιότητες, στην χημεία πολυμερών, στην σύνθεση βιοδραστικών ενώσεων (π.χ. αντικαρκινικά, αντιμικροβιακά) και ναφθαλιμιδίων. Αυτά με την σειρά τους έχουν βρεθεί ότι έχουν αντικαρκινική, αντιμικροβιακή ή αντιφλεγμονώδη επίδραση ⁹³. Ανάλογα βρίσκονται σε στάδιο κλινικών δοκιμών για την αντικαρκινική τους δράση και παρουσίασαν υψηλή συγγένεια δέσμευσης και εκλεκτικότητα στο DNA.



Εικόνα 24: Δομές αναλόγων 1,8-ναφθαλιμιδίου που βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές ⁹⁴.

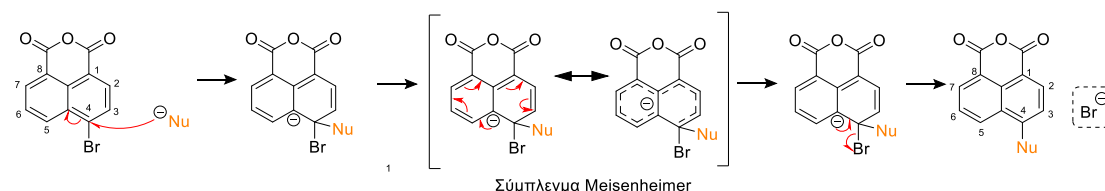
Επιπρόσθετα, είναι φθορίζουσες ενώσεις. Χρησιμοποιούνται ως οργανικές συσκευές εκπομπής φωτός (Organic light-emitting devices, OLEDs) και είναι βιοαισθητήρες και ανιχνευτές ιόντων. Τέλος, έχουν χρήση στην κυτταρική απεικόνιση του πυρήνα διότι εισέρχονται σε αυτόν μέσω παθητικής διάχυσης (είναι μικρό λιπόφιλο οργανικό μόριο χωρίς φορτίο) και στην επισήμανση του DNA λόγω της ιδιότητάς του να παρεμβάλλεται ανάμεσα σε δύο αζωτούχες βάσεις ⁹³.

Σε γενικές γραμμές η σύνθεση των μορίων αυτών ξεκινάει από τον 3- ή 4-υποκατεστημένο 1,8-ναφθαλικό ανυδρίτη, ενώσεις ευρέως εμπορικά διαθέσιμες και θα μπορούσε να χωριστεί σε δύο μέρη. Πρώτον, αντίδραση στον υποκαταστάτη για την σύνθεση του υποκατεστημένου-1,8-ναφθαλικού ανυδρίτη και δεύτερον, αντίδραση σχηματισμού ιμιδίου για την δημιουργία του υποκατεστημένου-1,8-ναφθαλιμιδίου. Στην παρούσα εργασία θα εστιάσουμε στον 4-βρώμο-1,8-ναφθαλικό ανυδρίτη ως βάση για τον σχεδιασμό και σύνθεσή αναλόγων ⁹².

1.12.1 Αντιδράσεις πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης

Ο 4-βρώμο-1,8-ναφθαλικός ανυδρίτης μπορεί να υποβληθεί σε διάφορες αντιδράσεις κάνοντάς τον εξαιρετικό υπόστρωμα για τον σχεδιασμό χρωστικών. Αρχικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα σε πυρηνόφιλες αρωματικές υποκαταστάσεις (Nucleophilic Aromatic Substitutions, S_NAr). Μηχανιστικά, το μονήρες ζεύγος του πυρηνόφιλου προσβάλλει τον άνθρακα 4, ο οποίος είναι ηλεκτρονιόφιλος λόγω του βρωμίου και των καρβονυλίων στις θέσεις 1 και 8 που έλκουν ηλεκτρονιακή πυκνότητα από το συζυγιακό σύστημα. Έτσι σχηματίζεται το ενδιάμεσο σύμπλεγμα Meisenheimer. Στην συνέχεια το βρώμιο αποχωρεί από το μόριο διότι είναι καλύτερη αποχωρούσα ομάδα από το πυρηνόφιλο και η αρωματικότητα επανέρχεται στο σύστημα. Παίρνουμε λοιπόν τον 4-υποκατεστημένο-1,8-ναφθαλικό ανυδρίτη. Οι τυπικές συνθήκες μιας τέτοιας αντίδρασης περιλαμβάνουν τη χρήση πολικού μη-πρωτικού διαλύτη (ακετόνη, διμεθυλοφορμαμίδιο,

διμεθυλοσουλφοξείδιο, διχλωρομεθάνιο), παρουσία βάσης για αποπρωτονίωση του πυρηνόφιλου (όπως ανθρακικό κάλιο ή νάτριο, υδροξείδιο του νατρίου, τριαιθυλαμίνη) και θέρμανση. Αν ως πυρηνόφιλο είναι μία πρωτοταγής ή δευτεροταγής αμίνη ως προϊόν παίρνουμε άρυλο-αμίνες, αν είναι αλκοόλη ή φαινόλη παίρνουμε άρυλο-αιθέρες και στην περίπτωση των θειολών παίρνουμε άρυλο-θειοαιθέρες ^{92,95}.



Εικόνα 25: Μηχανισμός πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης (S_NAr) του 4-βρώμο-1,8-ναφθαλικού ανυδρίτη.

1.12.2 Αντιδράσεις διασταυρούμενης σύζευξης

Άλλη μια κατηγορία αντιδράσεων είναι οι αντιδράσεις διασταυρούμενης σύζευξης (cross-coupling reactions) με καταλύτη σύμπλοκα παλλαδίου (Πίνακας 10), στις οποίες έχουμε δημιουργία δεσμού άνθρακα – άνθρακα. Τέτοιες αντιδράσεις είναι η σύζευξη Suzuki, η σύζευξη Sonogashira, η σύζευξη Stille και η αντίδραση Heck. Κοινά μηχανιστικά χαρακτηριστικά είναι η οξειδωτική προσθήκη (oxidative addition) του 4-βρώμο-1,8-ναφθαλικού ανυδρίτη στο σύμπλοκο του παλλαδίου (από Pd^0 σε Pd^{II}) και η αναγωγική απόσπαση (reductive elimination) του τελικού προϊόντος (Pd^{II} σε Pd^0) ^{92,95}.

Πίνακας 10: Σύμπλοκα του παλλαδίου που χρησιμοποιούνται ως καταλύτες στις αντιδράσεις διασταυρούμενης σύζευξης ^{95,96}.

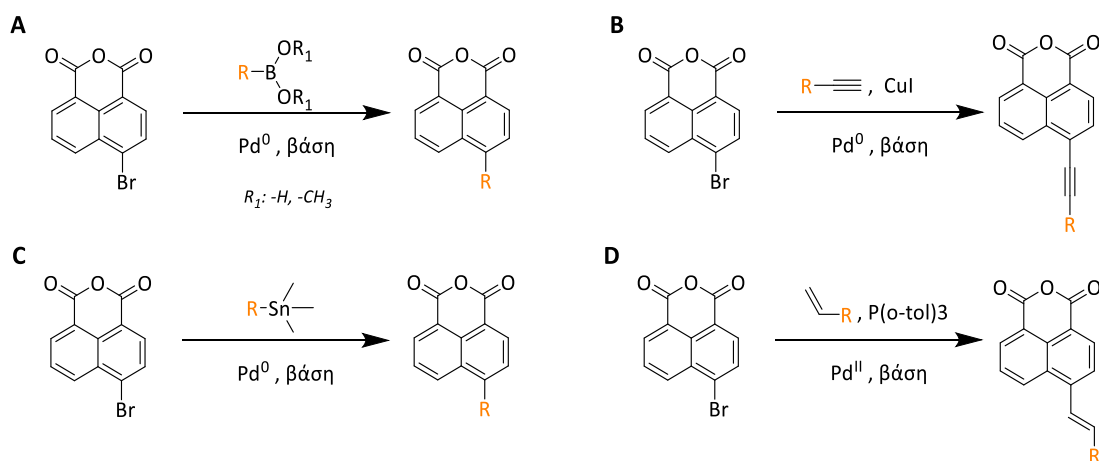
Όνομα	Συντομογραφία
Οξεικό παλλάδιο (II)	$Pd^{II}(OAc)_2$
Τετρα(τριφαινυλοφωσφίνη)παλλάδιο (0)	$Pd^0(PPh_3)_4$
Διχλωριούχο (1,1'-δις(διφαινυλφωσφίνο)σιδηροκένιο)παλλάδιο (II)	$Pd^{II}(dppf)Cl_2$

Αναλυτικότερα, στην σύζευξη Suzuki είναι δυνατή η σύζευξη του 4-βρώμο-1,8-ναφθαλικού ανυδρίτη με βορονικό οξύ ή βορονικό εστέρα με εισαγωγή των αντιδραστηρίων στον καταλυτικό κύκλο του Pd^0 , παρουσία βάσης. Αρχικά, έχουμε οξειδωτική προσθήκη του ανυδρίτη στο σύμπλοκο του Pd και αντικατάσταση του βρωμίου από το ιόν αλκοξειδίου ($R-O^-$). Έπειτα, ακολουθεί τρανσμετάλλωση (transmetalation, η ομάδα R της ενεργοποιημένης οργανοβορικής ένωσης μεταφέρεται στο σύμπλοκο και παίρνει την θέση του βρωμίου) και τέλος αναγωγική απόσπαση με αποβολή από τον καταλυτικό κύκλο του τελικού προϊόντος ^{95,96}.

Η σύζευξη Sonogashira περιλαμβάνει την αντίδραση του βρώμο-υποκατεστημένου ανυδρίτη με ένα τερματικό αλκίνιο, παρουσία Pd^0 ως καταλύτη και ιωδιούχο χαλκό (CuI) ως συν-καταλύτη. Πρώτα γίνεται οξειδωτική προσθήκη του 4-βρώμο-1,8-ναφθαλικού ανυδρίτη, τρανσμετάλλωση του αλκινίου-Cu (προϊόν της εισαγωγής του αλκινίου στον καταλυτικό κύκλο του CuI) και τέλος αναγωγικής απόσπαση του προϊόντος ^{95,96}.

Στην σύζευξη Stille ο ο 4-βρώμο-1,8-ναφθαλικός ανυδρίτης μπορεί να αντιδράσει με οργανοκασσιτερική ένωση ($R-SnBu_3$) με καταλύτη Pd^0 . Ακολουθεί παρόμοιο μηχανισμό με την Suzuki, πρώτα οξειδωτική προσθήκη του ανυδρίτη, ακολουθούμενη από τρανσμετάλλωση και τέλος αναγωγική απόσπαση του προϊόντος^{95,96}.

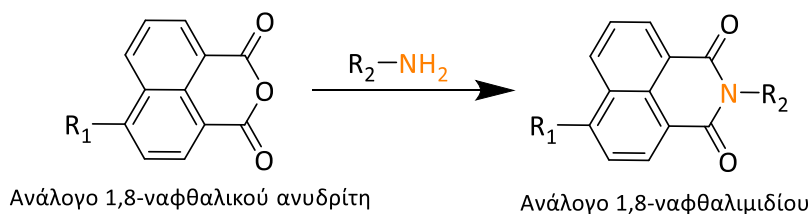
Τέλος, στην αντίδραση Heck ο 4-βρώμο-1,8-ναφθαλικός ανυδρίτης μπορεί να αντιδράσει με ένα αλκένιο παρουσία καταλύτη Pd^{II} , τρι(ο-τολυλ)φωσφίνη ($P(o-tol)_3$) για in-situ μετατροπή του καταλύτη σε Pd^0 και βάσης. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει οξειδωτική προσθήκη του ανυδρίτη, συν-προσθήκη του αλκενίου, συν-απόσπαση του προϊόντος και αναγωγική απόσπαση για αναγέννηση του καταλύτη^{95,96}.



Εικόνα 26: (A) Σύζευξη Suzuki, (B) Σύζευξη Sonogashira, (C) Σύζευξη Stille, (D) Αντίδραση Heck, με υπόστρωμα τον 4-βρώμο-1,8-ναφθαλικού ανυδρίτη.

1.12.3 Αντίδραση σχηματισμού ιμιδίου

Μία σημαντική αντίδραση του 4-υποκατεστημένου-1,8-ναφθαλικού ανυδρίτη αποτελεί η αντίδραση σχηματισμού ιμιδίου από κυκλικούς ανυδρίτες. Ο μηχανισμός σχηματισμού ξεκινάει με την προσβολή της αμίνης στον έναν από τους δύο ηλεκτρονιόφιλους καρβονυλικούς άνθρακες του ανυδρίτη. Αποτέλεσμα αυτής είναι η διάνοιξη του δακτυλίου και ο σχηματισμός ενδιάμεσου αμιδικού οξέος. Στην συνέχεια η δευτεροταγής αμίνη προσβάλει ενδομοριακά και το άλλο καρβονύλιο, όπου με απομάκρυνση νερού, κυκλοποιείται σχηματίζοντας το ανάλογο του 4-υποκατεστημένου-1,8-ναφθαλιμιδίου⁹⁷.



Εικόνα 27: Αντίδραση σχηματισμού 1,8-ναφθαλιμιδίων.

1.13 Σκοπός

Ο καρκίνος αποτελεί μια από τις σοβαρότερες και πολυπλοκότερες ασθένειες των τελευταίων ετών. Το γλοιώμα είναι ένας τύπος καρκίνου του κεντρικού νευρικού συστήματος που χαρακτηρίζεται από μεγάλη επιθετικότητα και θνησιμότητα. Η διάγνωση και αντιμετώπισή σε πρώιμο στάδιο είναι καθοριστική και έχει απασχολήσει ιδιαίτερα τις ερευνητικές ομάδες τα τελευταία χρόνια. Μεγάλο εμπόδιο αποτελεί ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός γιατί εμποδίζει την διείσδυση ενώσεων στον εγκέφαλο. Έτσι, οι έρευνες στράφηκαν σε ενώσεις που καλύπτουν ταυτόχρονα και την διάγνωση και την θεραπεία του γλοιώματος, γνωστές και ως θεραπευογνωστικές. Τα τελευταία χρόνια, ενθαρρυντικά αποτελέσματα παρουσιάζουν τα ραδιοθεραπευογνωστικά, θεραπευογνωστικές δηλαδή ενώσεις που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν ραδιοϊσότοπα μετάλλων.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο σχεδιασμός και σύνθεση ραδιοθεραπευογνωστικής πλατφόρμας για το γλοιώμα η οποία θα λειτουργεί ως διαγνωστικό εργαλείο τόσο μέσω φθορισμού όσο και μέσω ραδιομετάλλων (δύο κανάλια) ενώ ταυτόχρονα θα λειτουργεί και ως θεραπευτικό μέσο. Αυτή αποτελείται από το τμήμα της χρωστικής βασισμένη στο 4-υποκατεστημένο-1,8-ναφθαλιμίδιο που προσφέρει απεικόνιση στο ορατό ενώ ταυτόχρονα εκμεταλλευόμαστε την ικανότητα παρεμβολής του ανάμεσα στις βάσεις του DNA με αποτέλεσμα την αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και την καταστροφή τους, και το κομμάτι του χηλικού υποκαταστάτη όπου ανάλογα με το δεσμευμένο μέταλλο θα επιτυγχάνεται διάγνωση (με MRI, PET, SPECT), θεραπεία (α-σωματίδια, β-σωματίδια, ηλεκτρόνια Auger) ή και τα δύο μαζί. Στην συνέχεια έγιναν τροποποιήσεις με σκοπό την στόχευση των λυσοσωμάτων καθώς είναι οργανίδια υπεύθυνα για την πέψη και ανακύκλωση μακρομορίων, οργανιδίων, εξωγενών ουσιών και μετατροπή τους σε θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για τα καρκινικά κύτταρα, και τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης⁹⁸. Η ραδιοθεραπευογνωστικές ενώσεις μελετήθηκαν ως προς τις φωτοφυσικές τους ιδιότητες και τη κυτταροτοξική δράση των αναλόγων ναφθαλιμιδίου σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος T-98 και U-87. Τέλος έγινε επισήμανση με Τέρβιο 159, Ευρώπιο 152, Γαδολίνιο 157, Νεοδύμιο 144 καθώς και ραδιομέταλλα Τέρβιο 161, Λουτέσιο 177 και Γάλλιο 68, στα οποία έγιναν μελέτες *in vitro* σταθερότητας και *in vivo* βιοκατανομής.

Επιπλέον, σχεδιάστηκε και συντέθηκε μια πλατφόρμα εμπνευσμένη από το ^{99m}Tc-Tetrofosmin, έναν διαγνωστικό για τον προσδιορισμό της επιθετικότητας του γλοιώματος⁹⁹, που θα φέρει επιπλέον τον κυτταροτοξικό παράγοντα Τεμοζολομίδη, ο οποίος βρίσκεται ευρεία χρήση κατά του γλοιώματος και θα διαθέτει χηλικό υποκαταστάτη, για επισήμανση με Τεχνήτιο 99m για απεικόνιση μέσω SPECT/CT. Τα τμήματα συνδέονται με αλειφατικό συνδέτη. Επιπλέον, η πλατφόρμα διαθέτει την ικανότητα να στοχεύει τα υπερεκφραζόμενα μιτοχόνδρια των κυττάρων του γλοιώματος, οργανίδια υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας, λόγω θετικού φορτίου¹⁰⁰. Ακολούθησαν μελέτες σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος T-98 και U-87, ραδιοεπισήμανση με Τεχνήτιο 99m και πειράματα *in vitro* σταθερότητας και *in vivo* βιοκατανομής. Στην συνέχεια τροποποιήθηκε με σκοπό να προστεθεί η δυνατότητα πρόσδεσης στο N-τελικό άκρο ενός πεπτιδίου-φορέα που είναι γνωστό ότι διαπερνάει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (όπως Angioper-2 και T7 που εκμεταλλεύονται τον υποδοχέα LRP1, Low-density lipoprotein receptor-related protein-1^{101,102}), για μεγαλύτερη συγκέντρωση εντός του γλοιώματος και αύξηση της δράσης του.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά και μέθοδοι

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι εμπορικά διαθέσιμοι. Τα αντιδραστήρια που είναι επίσης εμπορικά διαθέσιμα και χρησιμοποιούνται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Η απομάκρυνση των διαλυτών γίνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα υπό ελαττωμένη πίεση σε κατάλληλη κάθε φορά θερμοκρασία, με απόσταξη υπό υψηλό κενό και στην λυοφιλίωση στα 0.01mbar στους 25°C.

Η πρόοδος των αντιδράσεων ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) με πλάκες Silica Gel 60 F₂₅₄. Οι πλάκες TLC οπτικοποιήθηκαν με έκθεση σε υπεριώδες φως στα 254nm και 366nm. Η χρώση των πλακών έγινε με διάλυμα υπερμαγγανικού καλίου (1g υπερμαγγανικό κάλιο και 2g ανθρακικό νάτριο σε 100ml H₂O) και διάλυμα νινυδρίνης (0.3g νινυδρίνης σε 100ml n-βουτανόλη και προσθήκη 3ml οξικού οξέος). Οι καθαρισμοί των ενδιάμεσων ενώσεων έγιναν με χρωματογραφία στήλης με Silica Gel 40-63 μm και με χρωματογραφία flash χρησιμοποιώντας το σύστημα SepaBean™ machine T με Silica Gel 60 40-63 μm. Τα τελικά μόρια καθαρίστηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) της Dionex χρησιμοποιώντας την ημιπροπαρασκευαστική στήλη: Jupiter 4μm Proteo 90 Å, LC Column 250x10mm και ανιχνευτή UV/Vis στα 254nm.

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου και άνθρακα (¹H-NMR/¹³C-NMR) καταγράφηκαν σε φασματόμετρο Bruker Avance DPX 250 MHz NMR στους 25°C. Τα φάσματα δυο διαστάσεων (2D-NMR) καταγράφηκαν σε φασματόμετρο Bruker Avance 500 MHz NMR στους 25°C. Οι μετατοπίσεις για τα φάσματα ¹H NMR αναφέρονται ως τιμές δ (μέρη ανά εκατομμύριο/ ppm). Οι πολλαπλότητες δίνονται ως εξής: s (μονή), d (διπλή), dd (διπλή διπλής), t (τριπλή), bs (ευρεία μονή) και m (πολλαπλές). Οι σταθερές σύζευξης αναφέρονται ως τιμές J (Hz). Το πρόγραμμα TopSpin 4.1.3 χρησιμοποιήθηκε για την λειτουργία του οργάνου και την επεξεργασία των φασμάτων. Για την λήψη φασμάτων μάζας χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο μάζας Xevo G2 Q-TOF το οποίο λειτουργούσε σε θετική λειτουργία ηλεκτροψεκασμού ιοντισμού (ESI) για ανάλυση άμεσης έγχυσης, χρησιμοποιώντας πλήρη σάρωση MS σε εύρος μάζας 50–1200 m/z.

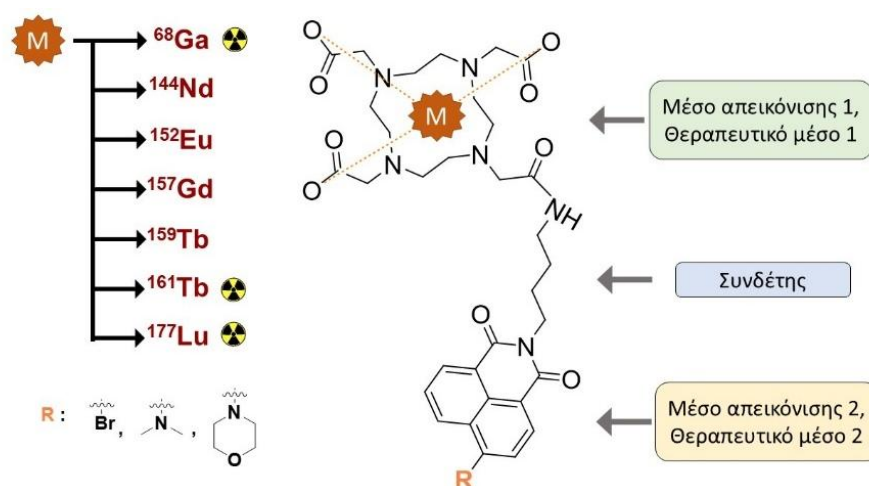
Η καθαρότητα των τελικών μορίων αξιολογήθηκε και με αναλυτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) χρησιμοποιώντας στήλη: Infinity Lab Poroshell 120 EC-C18, 4.6x150mm και ανιχνευτή με συστοιχία διόδων (DAD) στα 214nm και 254nm. Το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε είναι από A:98%/B:2% έως A:0%/B:100% όπου A: H₂O + 0.1% FA και B: MeCN + 0.1% FA, με σταθερή ροή 1.0 mL/min και χρόνο 15 λεπτά. Το τυφλό δείγμα της μεθόδου ήταν 70μl DMSO - 930μl H₂O (ίδιο με αυτό στην προετοιμασία του κάθε δείγματος). Για τα δείγματα, 70μl από διάλυμα 10μM της κάθε ένωσης σε DMSO, αραιώθηκαν σε τελικό όγκο 1ml με νερό (τελική συγκέντρωση 0.7μM).

Τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis καταγράφηκαν με φασματοφωτόμετρο Edinburg D5S ενώ τα φάσματα φθορισμού με φθορισμόμετρο Edinburg F5S, και τα δύο χρησιμοποιώντας κυψελίδα χαλαζία 1 cm σε σταθερή θερμοκρασία.

Η αρίθμηση των ατόμων στις δομές των μορίων δεν έχει γίνει κατά την Διεθνή Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC).

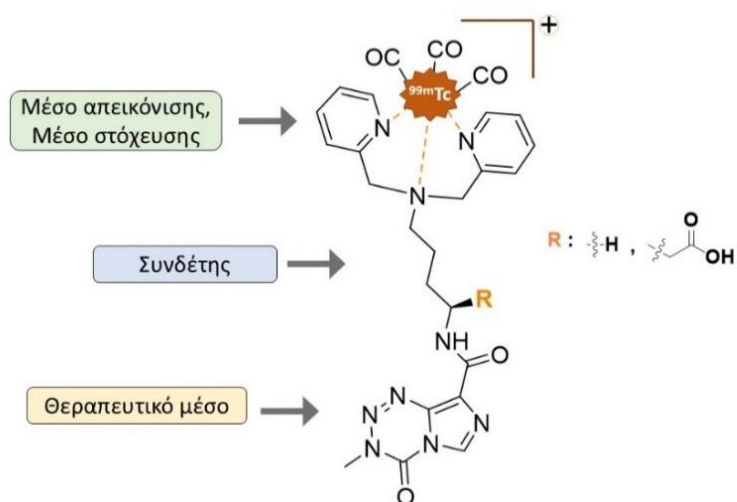
2.2 Λογικός σχεδιασμός των ενώσεων

Η ραδιοθεραπευτική πλατφόρμα 7 που σχεδιάστηκε αποτελείται από τρία τμήματα. Το πρώτο είναι το 1,8-ναφθαλιμίδιο όπου αξιοποιούνται οι φωτοφυσικές του ιδιότητες και η κυτταροτοξικότητα του λόγω παρεμβολής στο DNA. Αυτό, φέρει και τις λειτουργικές ομάδες στόχευσης των λυσοσωμάτων. Το δεύτερο μέρος είναι ένας αλκιφατικός συνδέτης που ενώνει τα δύο τμήματα. Το τρίτο μέρος είναι ο χηλικός υποκαταστάτης DOTA όπου θα γίνεται η δέσμευση του εκάστοτε ραδιομετάλλου. Έτσι έχουμε δύο κανάλια απεικόνισης του καρκινικού όγκου (φθορισμό / MRI ή PET ή SPECT) και δυο κυτταροτοξικούς παράγοντες (του ναφθαλιμιδίου / α- ή β- σωματίδια, ή ηλεκτρόνια “Auger”).



Εικόνα 28: Σχηματική απεικόνιση της ραδιοθεραπευτικής πλατφόρμας.

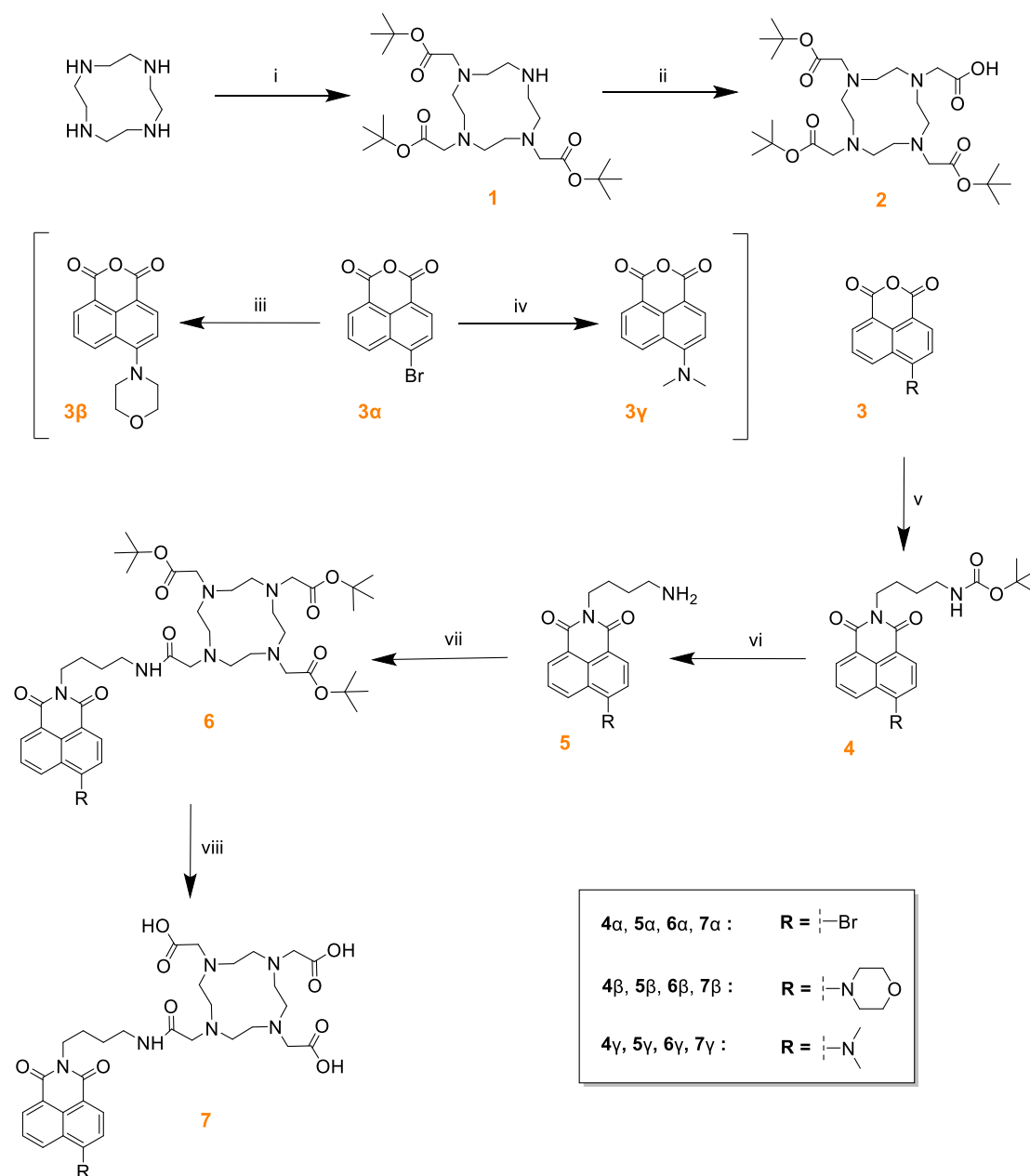
Ο σχεδιασμός των ενώσεων 10 και 14 αποτελείται επίσης από τρία μέρη. Πρώτο είναι ο χηλικός υποκαταστάτης εμπνευσμένος από το ^{99m}Tc-Tetrofosmin, που θα δεσμεύσει το Τεχνητό 99m και θα λειτουργεί ως στόχευση για τα μιτοχόνδρια λόγω του σχηματιζόμενου θετικού φορτίου της ένωσης και του αρνητικού δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης ¹⁰³, αλλά και απεικόνιση με SPECT/CT. Το δεύτερο είναι το αντικαρκινικό φάρμακο Τεμοζολομίδα το οποίο χρησιμοποιείται συχνά στις χημειοθεραπείες για το γλοίωμα. Τέλος το τρίτο μέρος είναι ο αλκιφατικός συνδέτης που τα συνδέει. Σε αυτό το τμήμα γίνεται και η τροποποίηση για βελτίωση της δράσης του με σύνδεση σε πεπτίδιο φορέα είτε στο τελικό άκρο διαθέτοντας τον παράγοντα Τεμοζολομίδα (ένωση 14), είτε ανάμεσα στην αλληλουχία των φορέων ως τροποποιημένο αμινοξύ (ένωση 13).



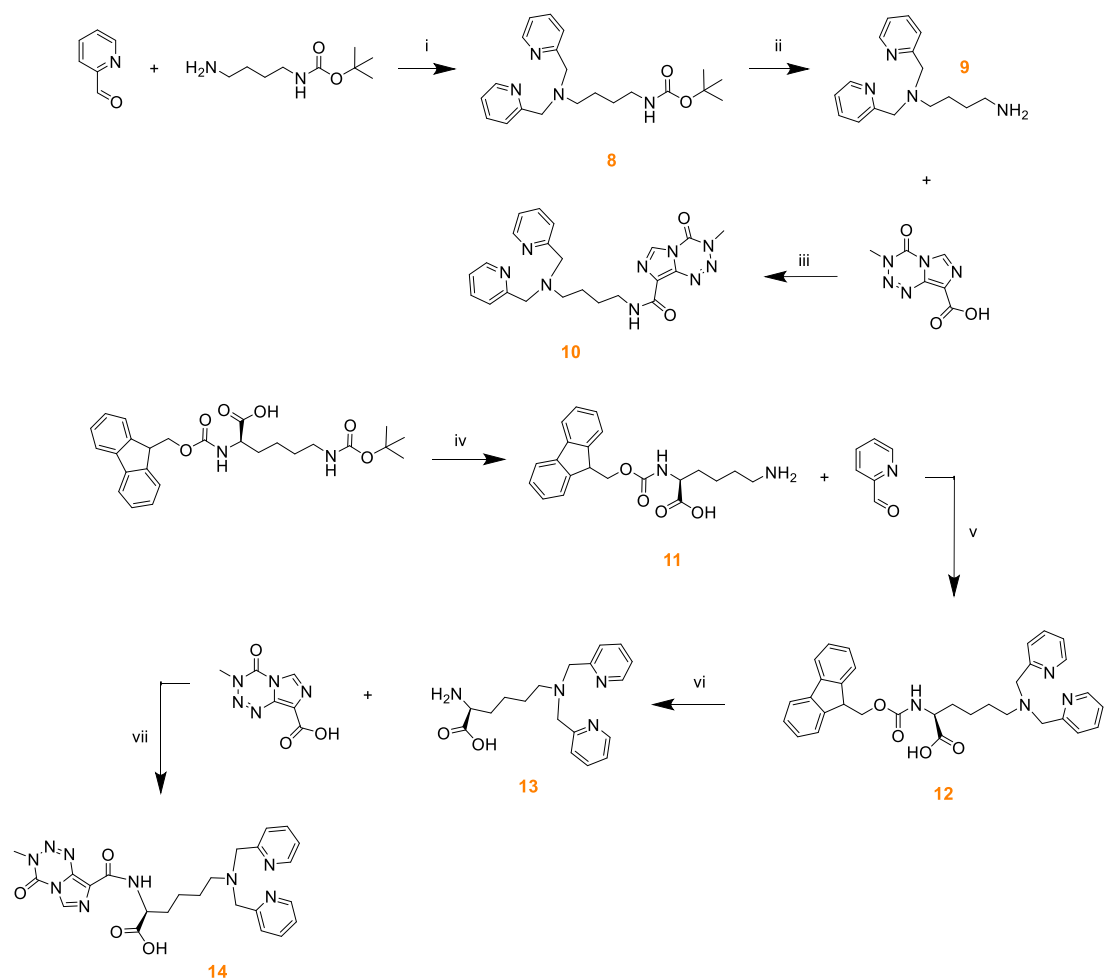
Εικόνα 29: Σχηματική αναπαράσταση της ραδιοθεραπογνώστικής πλατφόρμας.

Στην Εικόνα 30 απεικονίζεται η συνολική πειραματική πορεία των τελικών ενώσεων που συντέθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης. Η σύνθεση ξεκίνησε από το 1,4,7,10-τετραζακυκλοδωδεκάνιο και τον 4-βρώμο-1,8-ναφθαλικό ανυδρίτη. Η αναλυτική σύνθεση καθώς και η ταυτοποιήσεις των ενδιάμεσων και τελικών ενώσεων παρατίθενται στις υποενότητες 2.3 με 2.10.

Στην Εικόνα 31 απεικονίζεται η συνολική πειραματική πορεία των τελικών 10 και 14 ενώ η αναλυτική σύνθεση και ταυτοποίηση των ενδιάμεσων και τελικών ενώσεων παρατίθενται στις υποενότητες 2.11.1 με 2.16.2.

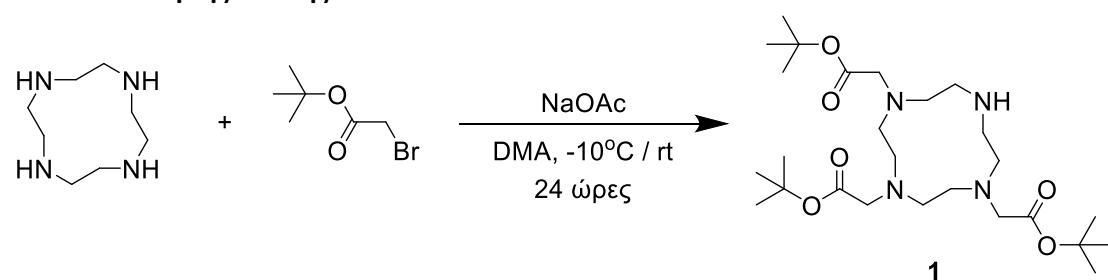


Εικόνα 30: Συνθετική πορεία των τελικών μορίων 7α, 7β, 7γ. (i) βρωμοξικού *t*-βουτυλεστέρα, NaOAc, DMA, -10°C-rt, 24h, (ii) βρωμοξικό οξύ, K₂CO₃, άνυδρο DMF, rt, 24h, (iii) μορφολίνη, 2-μεθοξυαιθανόλη, rt-160°C, 5h, (iv) διαιθυλαμίνη, DMF, reflux, 12h, (v) *N*-(τερτ-βουτοξυκαρβονυλ)-1,4-βουτανοδιαμίνη, άνυδρη EtOH ή DMF, reflux, 10h, (vi) 25% TFA/CH₂Cl₂, 12h, (vii) ένωση 2, PyBOP, TEA, άνυδρο DMF, rt, 12h, (viii) 50% TFA/CH₂Cl₂, 12h.

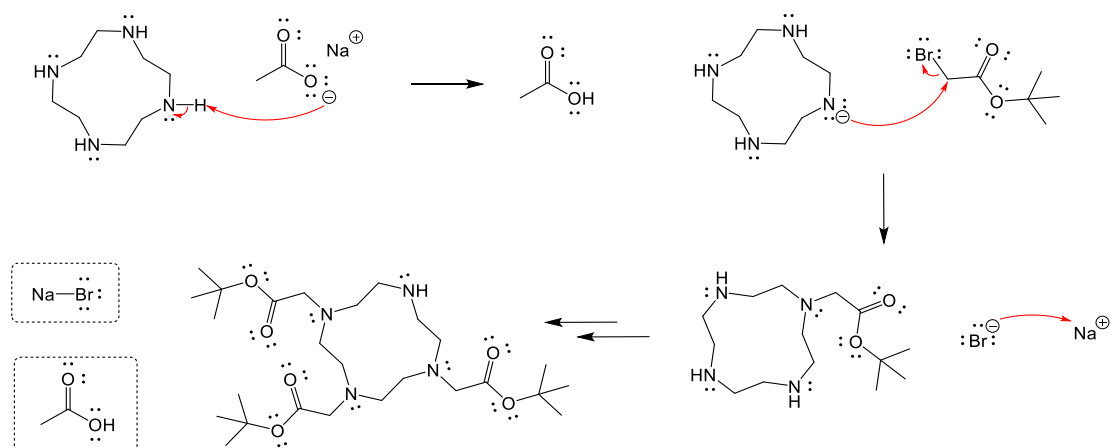


Εικόνα 31: Συνθετική πορεία των τελικών μορίων 10 και 14. (i) $\text{Na}(\text{AcO})_3\text{BH}$, $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$, 0°C -rt, 4h, (ii) 20% TFA/ CH_2Cl_2 , 2h, (iii) PyBOP, DIPEA, άνυδρο DMF, rt, 12h, (iv) 20% TFA/ CH_2Cl_2 , 4h, (v) $\text{Na}(\text{AcO})_3\text{BH}$, $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$, 0°C -rt, 12h, (vi) 20% πιπεριδίνη/DMF, rt, 30min, (vii) PyBOP, DIPEA, άνυδρο DMF, rt, 30h.

2.3.1 Σύνθεση της Ένωσης 1



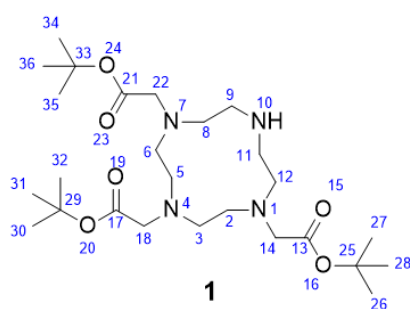
Εικόνα 32: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης 1.



Εικόνα 33: Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού της Ένωσης 1.

Σε ξηρή σφαιρική φιάλη προστίθεται 1,4,7,10-τετραζακυκλοδωδεκάνιο (300mg, 1.7411mmol) και οξικό νάτριο (471.3mg, 5.7457mmol) με 5ml διμεθυλοακεταμίδιο (Dimethylacetamide, DMA) ως διαλύτη. Το μίγμα ψύχεται σε θερμοκρασία -10°C και αναδεύεται υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Ποσότητα βρωμοξικού t-βουτυλεστέρα (849.2μl, 5.7457mmol) διαλύεται σε 3 ml DMA και προστίθεται στάγδην σε διάστημα 15 λεπτών. Το μίγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύεται για 24 ώρες. Έπειτα, η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 20ml H_2O και το διάλυμα γίνεται διαυγές. Στερεό όξινο ανθρακικό νάτριο προστίθεται αργά μέχρι τον σχηματισμό ιζήματος ($4 \times 200\text{mg}$). Το ίζημα φιλτράρεται και επαναδιαλύεται σε CH_2Cl_2 (30ml), το οποίο εκχυλίζεται με H_2O ($3 \times 20\text{ml}$). Η οργανική στοιβάδα συλλέγεται, ξηραίνεται με Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Τέλος, στο υποκίτρινο λάδι προστίθεται διαιθυλαιθέρας (15ml) και το μίγμα αναδεύεται για ακόμα 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το επιθυμητό προϊόν κατακρημνίζεται ως λευκό στερεό το οποίο φιλτράρεται, πλένεται με παγωμένο διαιθυλαιθέρα και ξηραίνεται. Το προϊόν χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό

104,105



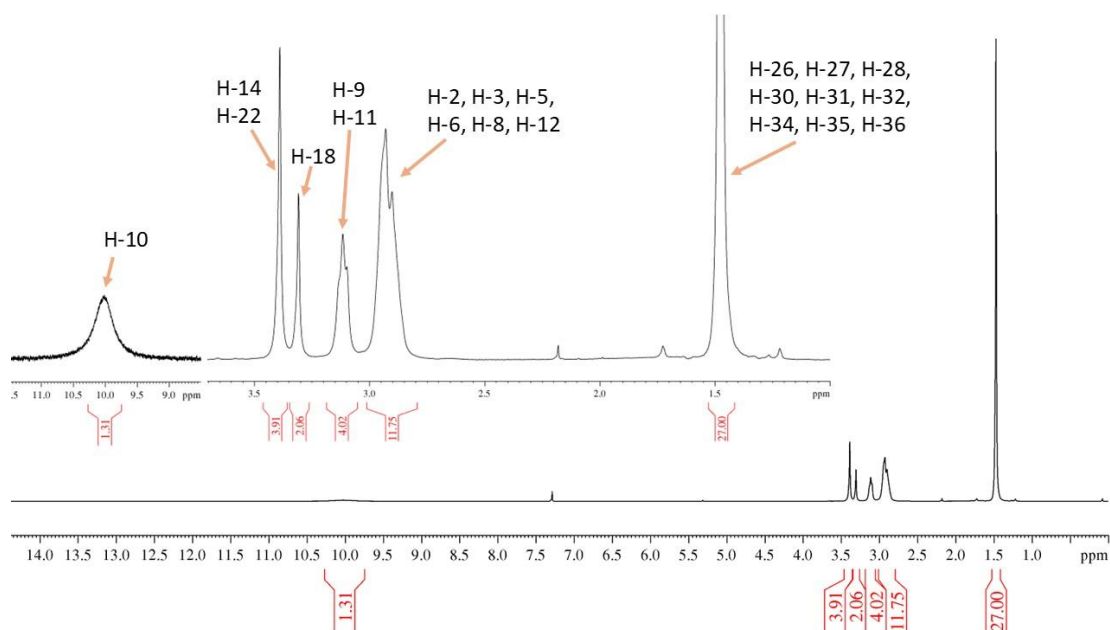
Ένωση 1: 2,2',2''-(1,4,7,10-τετραζακυκλοδωδεκανο-1,4,7-τριυλ)τριαξικό τρι-τριτ-βουτυλεστέρα

Ποσότητα 607.7mg, απόδοση 67.8%

$R_f=0.37$ σε 5% v/v $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ και εμφάνιση με διάλυμα νινυδρίνης

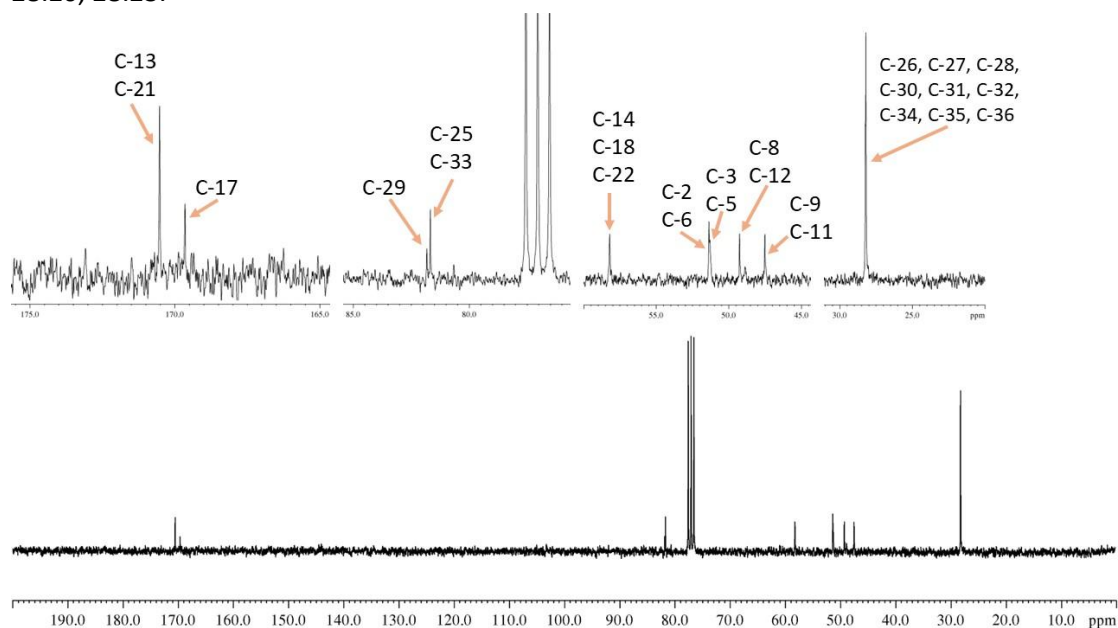
2.3.2 Χαρακτηρισμός της ένωσης 1

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ : 9.99 (s, 1H), 3.36 (s, 4H), 3.28 (s, 2H), 3.09 (t, $J = 4.9$ Hz, 4H), 2.88 (q, $J = 5.4$ Hz, 12H), 1.44 (d, $J = 1.8$ Hz, 27H).



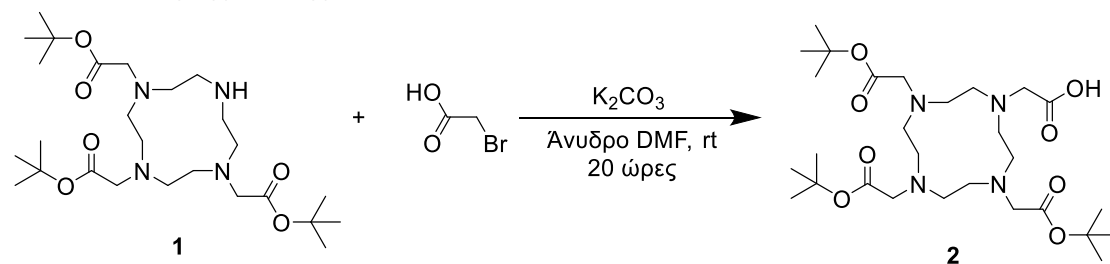
Εικόνα 34: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 1 σε $\text{CDCl}_3\text{-d}$ με μεγεθύνσεις στις κορυφές των πρωτονίων.

$^{13}\text{C NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) δ : 170.53, 169.65, 81.83, 81.67, 58.21, 51.37, 49.26, 47.52, 28.20, 28.23.

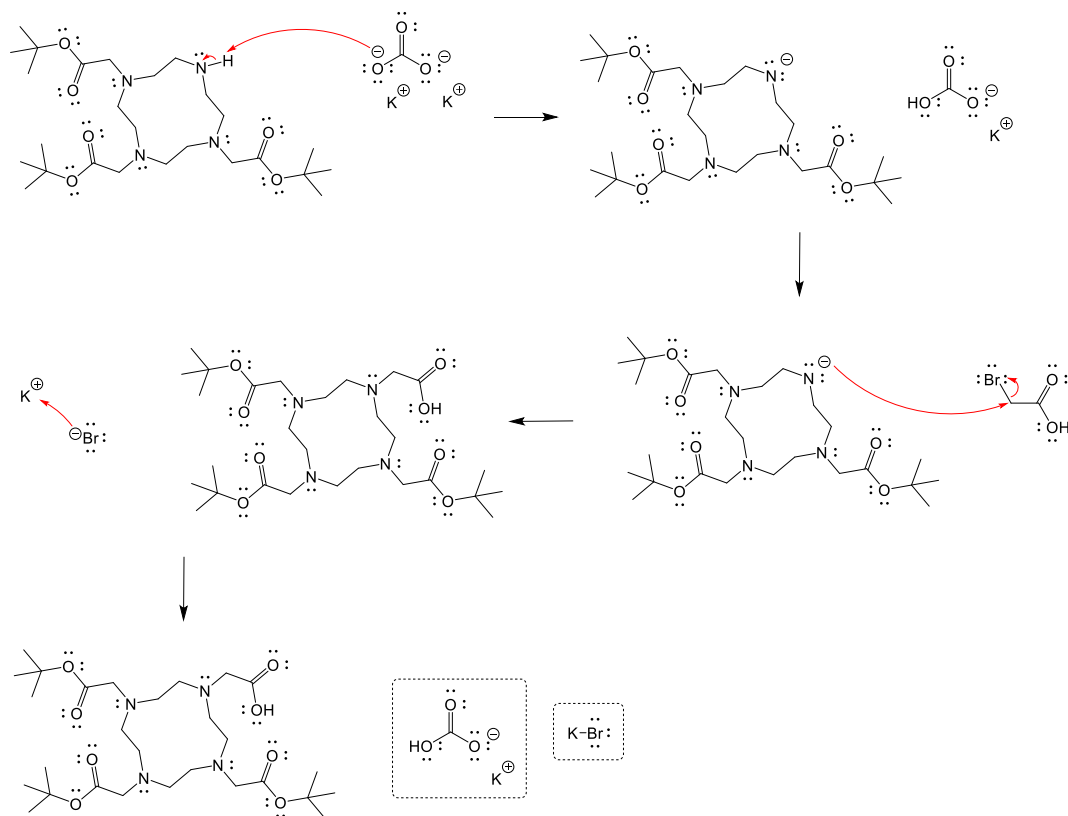


Εικόνα 35: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης 1 σε $\text{CDCl}_3\text{-d}$ με μεγεθύνσεις στις κορυφές των ανθράκων.

2.4.1 Σύνθεση της Ένωσης 2

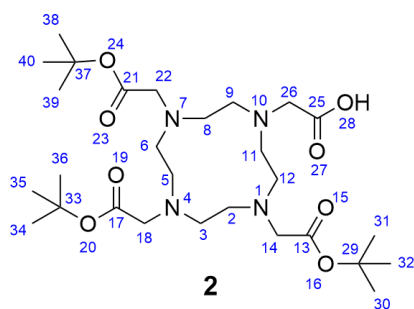


Εικόνα 36: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης 2.



Εικόνα 37: Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού της Ένωσης 2.

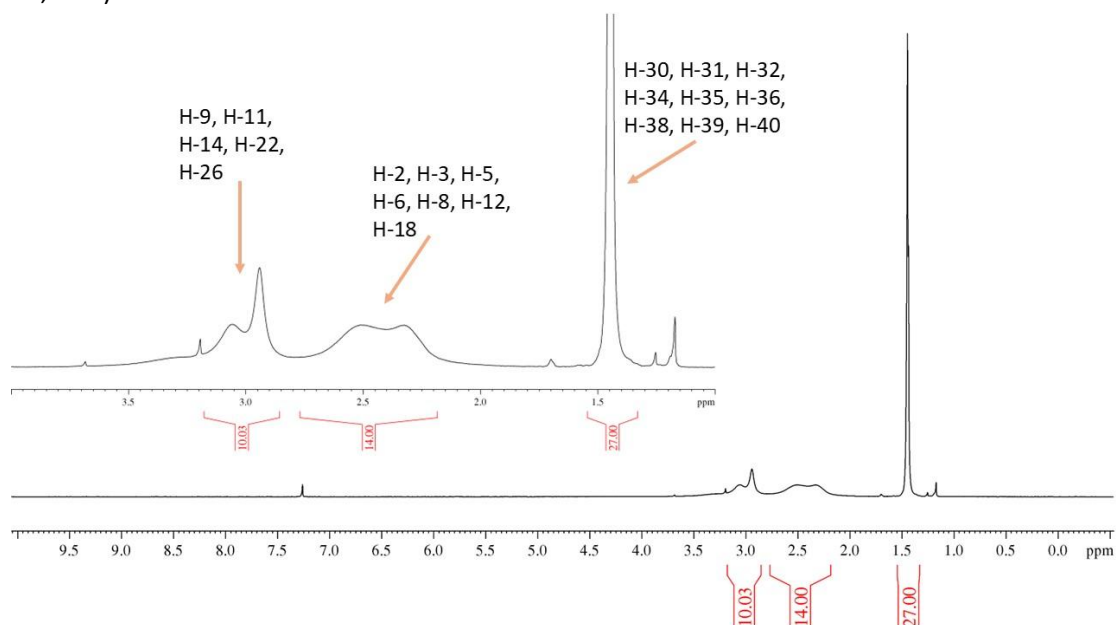
Σε ξηρή σφαιρική φιάλη προστίθεται η ένωση **1** (200mg, 0.3357mmol), άνυδρο ανθρακικό κάλιο (139.2mg, 1.007mmol) και άνυδρο διμεθυλοφορμαμίδιο (Dimethylformamide, DMF, 4ml) ως διαλύτης. Το μίγμα αναδεύεται για 15 λεπτά υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Στην συνέχεια γίνεται προσθήκη του βρωμοξικού οξέος (69.9mg, 0.5036mmol) και η ανάδευση συνεχίζεται για 30 ώρες. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Μετά την ολοκλήρωσή της, ο διαλύτης απομακρύνεται με απόσταξη υπό υψηλό κενό. Το ακατέργαστο μίγμα καθαρίζεται με Flash χρωματογραφία στήλης με διαλύτες CH₂Cl₂-MeOH. Το επιθυμητό προϊόν εκλούστηκε σε ποσοστό 5% MeOH/CH₂Cl₂. Ο διαλύτης απομακρύνθηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα δίνοντας την ένωση **2** ως ελαφρύ γκρι-λευκό στερεό^{104,106}.



Ένωση **2**: 2-(4,7,10-τρικ(2-(τριτ-βουτοξυ)-2-οξοαιθυλ)-1,4,7,10-τετραζακυκλοδωδεκαν-1-υλ)οξικό οξύ
 Ποσότητα 101.2mg, απόδοση 52.6%
 $R_f=0.1$ σε 10% v/v MeOH/CH₂Cl₂ και εμφάνιση με διάλυμα υπερμαγγανικού καλίου

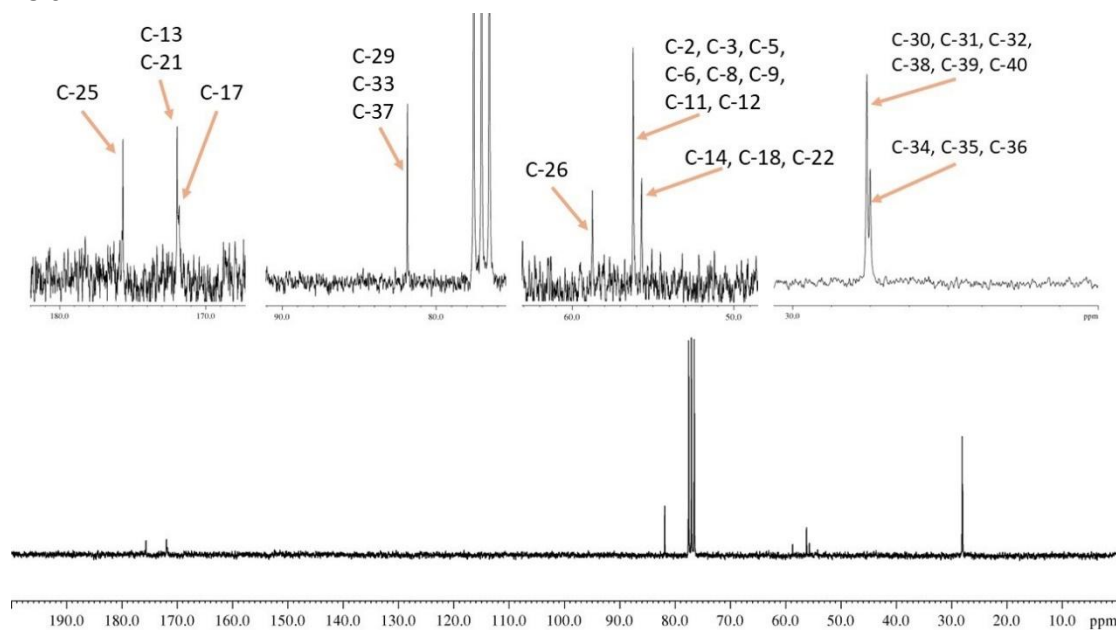
2.4.2 Χαρακτηρισμός της ένωσης 2

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 3.12 – 2.87 (m, 10H), 2.75 – 2.18 (m, 14H), 1.44 (d, J = 2.8 Hz, 27H).

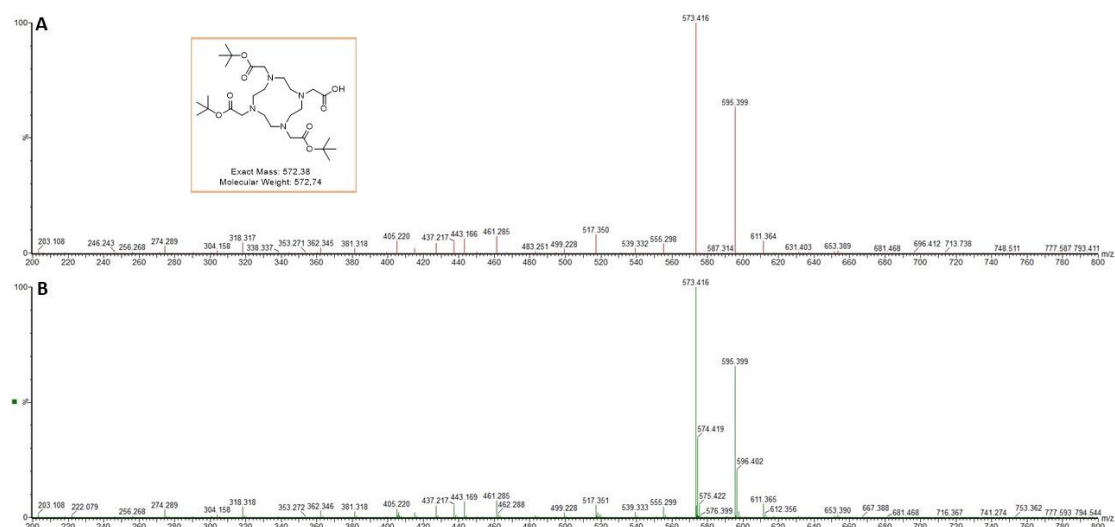


Εικόνα 38: Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 2 σε CDCl_3 -d με μεγεθύνσεις στις κορυφές των πρωτονίων.

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 175.67, 171.96, 171.8, 81.86, 58.74, 56.22, 55.70, 28.09, 28.01.

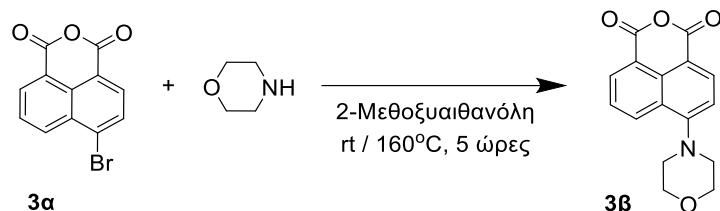


Εικόνα 39: Φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης 2 σε CDCl_3 -d με μεγεθύνσεις στις κορυφές των ανθράκων.

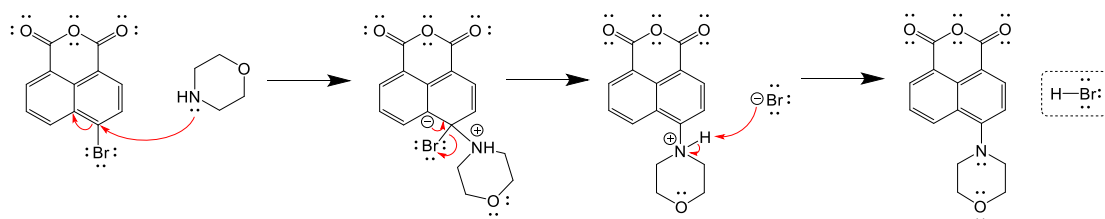


Εικόνα 40: (B) Φάσμα ESI-MS και (A) φάσμα ESI-MS με TOF Transform της ένωσης 2 με το επιθυμητό m/z : $[M+H]^+=573.4162$, καθώς και το $[M+Na]^+=595.3989$, $[M+K]^+=611.3638$.

2.5.1 Σύνθεση της Ένωσης 3β

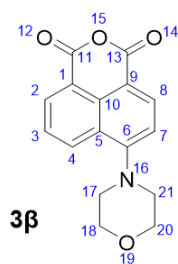


Εικόνα 41: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης 3β.



Εικόνα 42: Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού της Ένωσης 3β.

Σε σφαιρική φιάλη, ποσότητα του 4-βρωμο-1,8-ναφθαλικού ανυδρίτη (500mg, 1.8045mmol) διαλύεται σε 2-μεθοξαιθανόλη (7ml). Μετά από 5 λεπτά ανάδευσης σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται η μορφολίνη (311.1μl, 3.6091mmol) και η ανάδευση συνεχίζεται για 20 λεπτά στην ίδια θερμοκρασία και στη συνέχεια για 5 ώρες στους 120°C. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και αποχύνεται αργά σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει υπό ανάδευση 100ml H₂O. Το σχηματιζόμενο ίζημα φιλτράρεται, πλένεται με H₂O και ξηραίνεται στην λυοφιλίωση, δίνοντας το επιθυμητό χρυσό-κίτρινο προϊόν ¹⁰⁷.



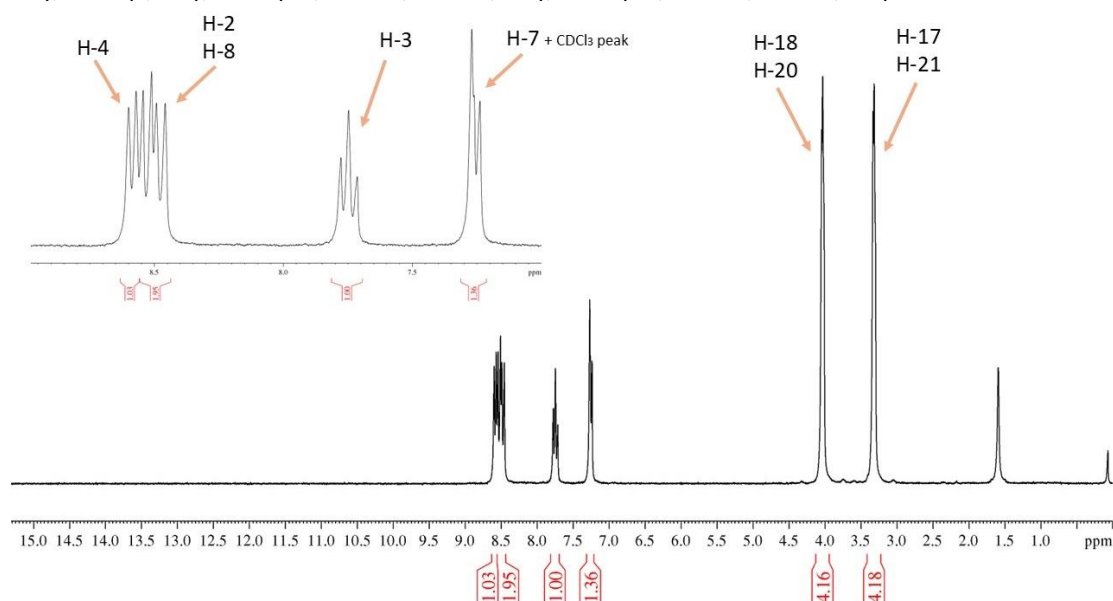
Ένωση **3β**: 6-(μορφολινο)-1H,3H-βενζο[de]ισοχρωμενο-1,3-διόνη

Ποσότητα 446.8mg, απόδοση 89.3 %

R_f=0.56 σε 5% v/v MeOH/CH₂Cl₂

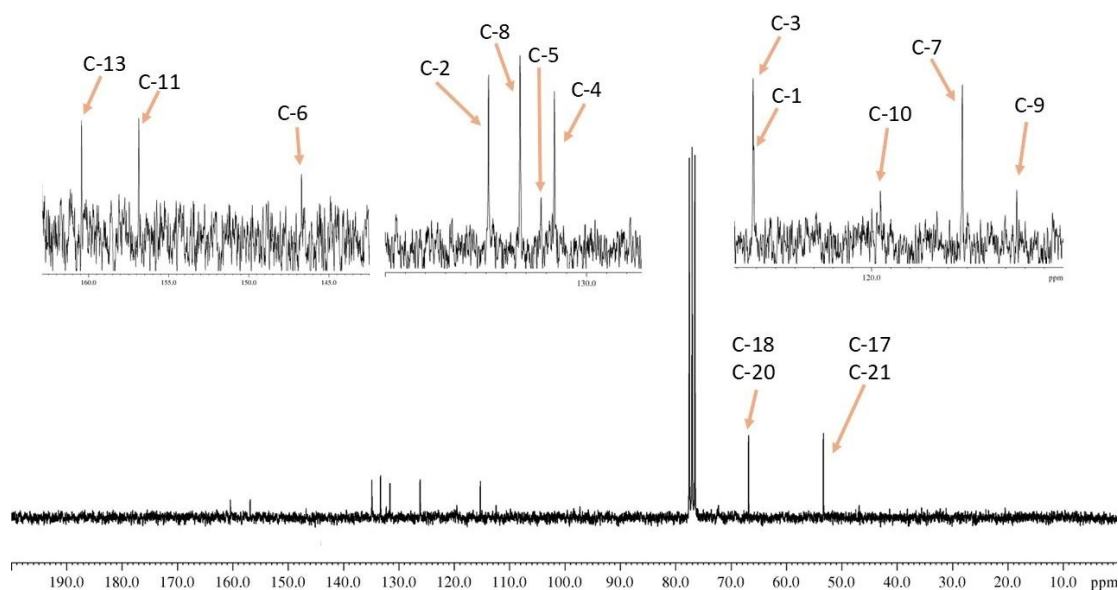
2.5.2 Χαρακτηρισμός της ένωσης 3β

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.56 (ddd, *J* = 14.7, 12.8, 7.9 Hz, 3H), 7.77 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 4.05 (dd, *J* = 6.0, 3.1 Hz, 4H), 3.34 (dd, *J* = 5.4, 3.5 Hz, 1H).



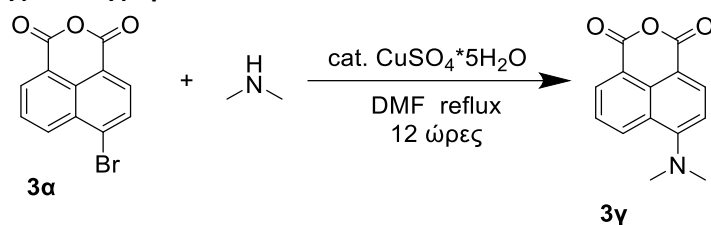
Εικόνα 43: Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης 3β σε CDCl₃-d με μεγεθύνσεις στις κορυφές των πρωτονίων.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 160.47, 156.91, 146.73, 134.87, 133.31, 132.26, 131.60, 126.17, 126.14, 119.54, 115.26, 112.40, 66.83, 53.31.

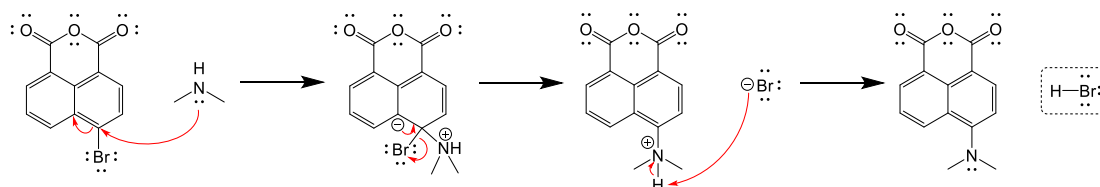


Εικόνα 44: Φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης **3b** σε $\text{CDCl}_3\text{-d}$ με μεγεθύνσεις στις κορυφές των ανθράκων.

2.6.1 Σύνθεση της Ένωσης **3γ**

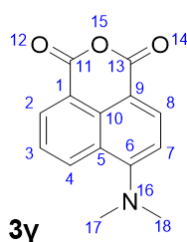


Εικόνα 45: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης **3γ**.



Εικόνα 46: Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού της Ένωσης **3γ**.

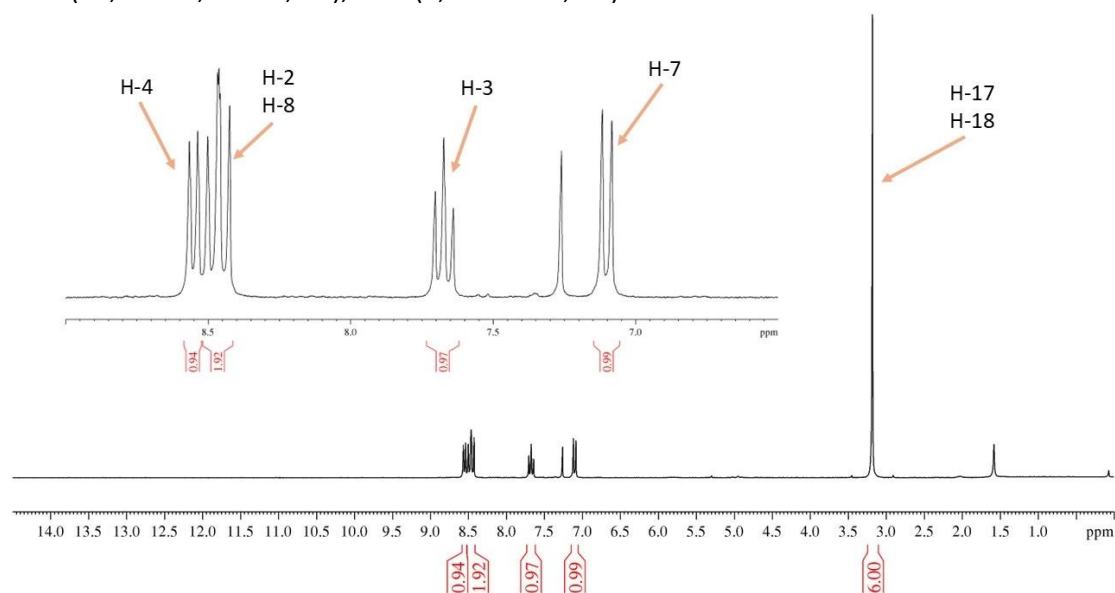
Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη, ποσότητα του 4-βρωμο-1,8-ναφθαλικού ανυδρίτη (200mg, 0.7218mmol) και διαιθυλαμίνης (58.3μl, 0.8662mmol) διαλύονται σε 7ml DMF. Στην αντίδρασης προστίθεται καταλυτική ποσότητα $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ και αναδεύεται υπό αναρροή για 12 ώρες. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μίγμα αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθενται 15ml H_2O για την καταβύθιση καφέ ιζήματος. Το ίζημα φιλτράρεται και ξηραίνεται πριν επαναδιαλυτοποιηθεί σε CH_2Cl_2 (100ml) και φιλτραριστεί εν νέου. Το διήθημα συλλέγεται, ξηραίνεται με Na_2SO_4 και συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το ακατέργαστο προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών εξάνιο/ CH_2Cl_2 . Σε ποσοστό 100% CH_2Cl_2 εκλούστηκε η ένωση **3γ** και μετά από απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα παίρνουμε το ανοιχτό πορτοκαλί προϊόν ¹⁰⁸.



Ένωση **3γ**: 6-(διμεθυλαμινο)-1H,3H-βενζο[de]ισοχρωμενο-1,3-διόνη
 Ποσότητα 161.2 mg, απόδοση 92.5 %
 $R_f=0.6$ σε 5% v/v MeOH/CH₂Cl₂

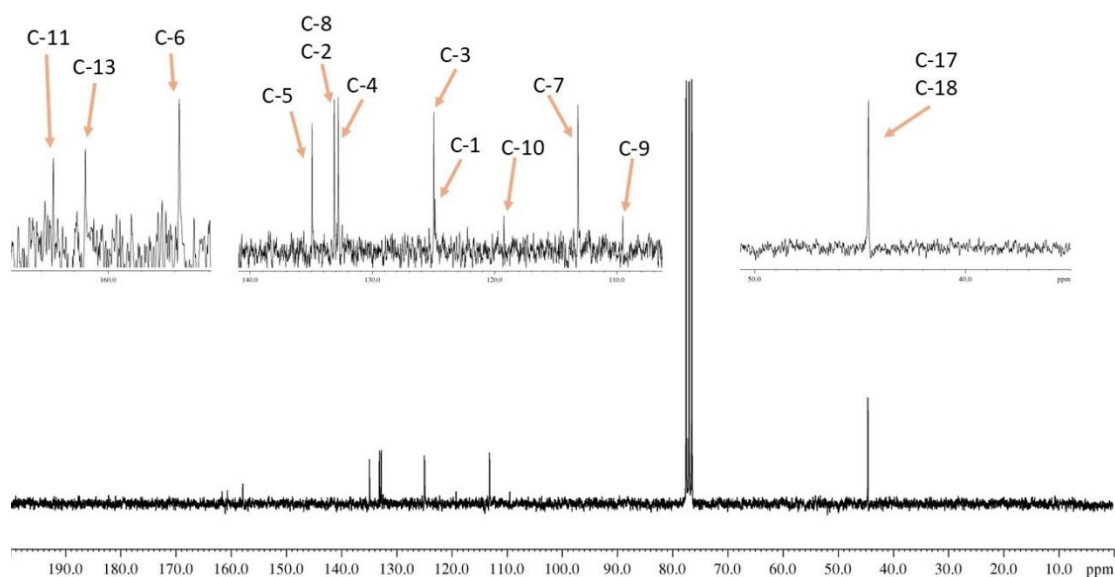
2.6.2 Χαρακτηρισμός της ένωσης 3γ

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl₃) δ : 8.63 – 8.42 (m, 3H), 7.70 (ddd, $J = 8.5, 7.3, 1.1$ Hz, 1H), 7.13 (dd, $J = 8.3, 1.1$ Hz, 1H), 3.21 (d, $J = 1.2$ Hz, 6H).



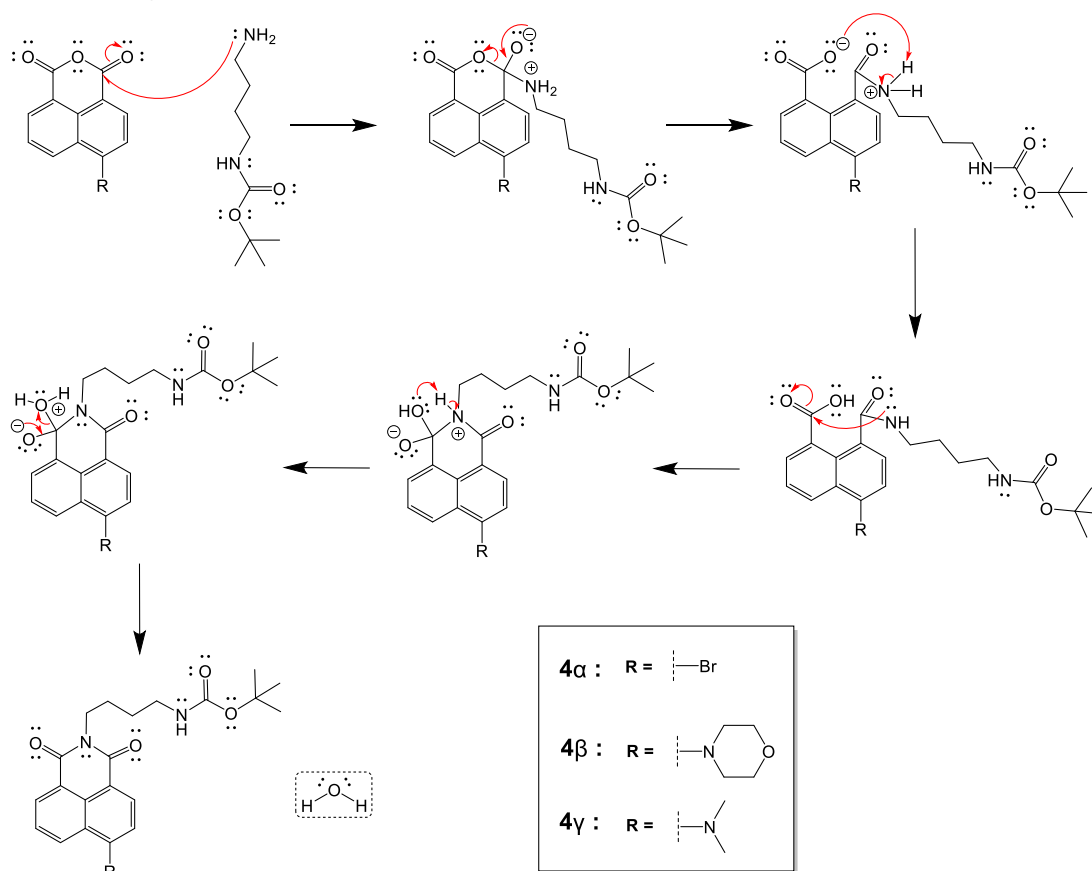
Εικόνα 47: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 3γ σε CDCl₃-d με μεγεθύνσεις στις κορυφές των πρωτονίων.

$^{13}\text{C NMR}$ (63 MHz, CDCl₃) δ : 161.62, 160.69, 157.88, 134.93, 133.12, 132.79, 124.97, 124.86, 119.25, 113.18, 109.57, 44.59.



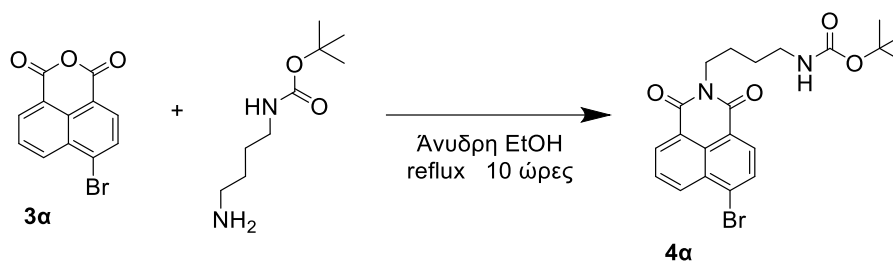
Εικόνα 48: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης 3γ σε CDCl₃-d με μεγεθύνσεις στις κορυφές των ανθράκων.

2.7 Σύνθεση των Ενώσεων 4



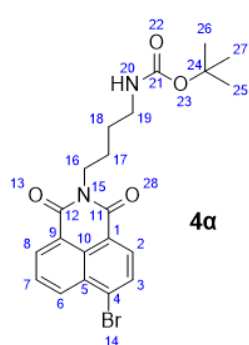
Εικόνα 49: Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού των ενώσεων 4α, 4β και 4γ.

2.7.1 Σύνθεση της Ένωσης 4α



Εικόνα 50: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης 4α.

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται 4-βρωμο-1,8-ναφθαλικός ανυδρίτης (200mg, 0.7218mmol) και 8ml αιθανόλης (EtOH). Το μίγμα αναδεύεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια προστίθεται η N-(τριτ-βουτοξυκαρβονυλ)-1,4-βουτανοδιαμίνη (137.6μl, 0.7218mmol). Η ανάδευση συνεχίζεται σε reflux για 10 ώρες. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Μετά την πλήρη κατανάλωση της διαμίνης το μίγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα στους 4°C για 10 λεπτά. Το ίζημα που σχηματίστηκε φιλτράρεται και εκπλένεται με εξάνιο (2 x 10ml). Το ακατέργαστο προϊόν καθαρίζεται με flash χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών CH2Cl2/MeOH. Η ένωση **4α** εκλούστηκε σε ποσοστό 2% MeOH/CH2Cl2. Ο διαλύτης απομακρύνθηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα δίνοντας απαλό κίτρινο-άσπρο στερεό ¹⁰⁹.



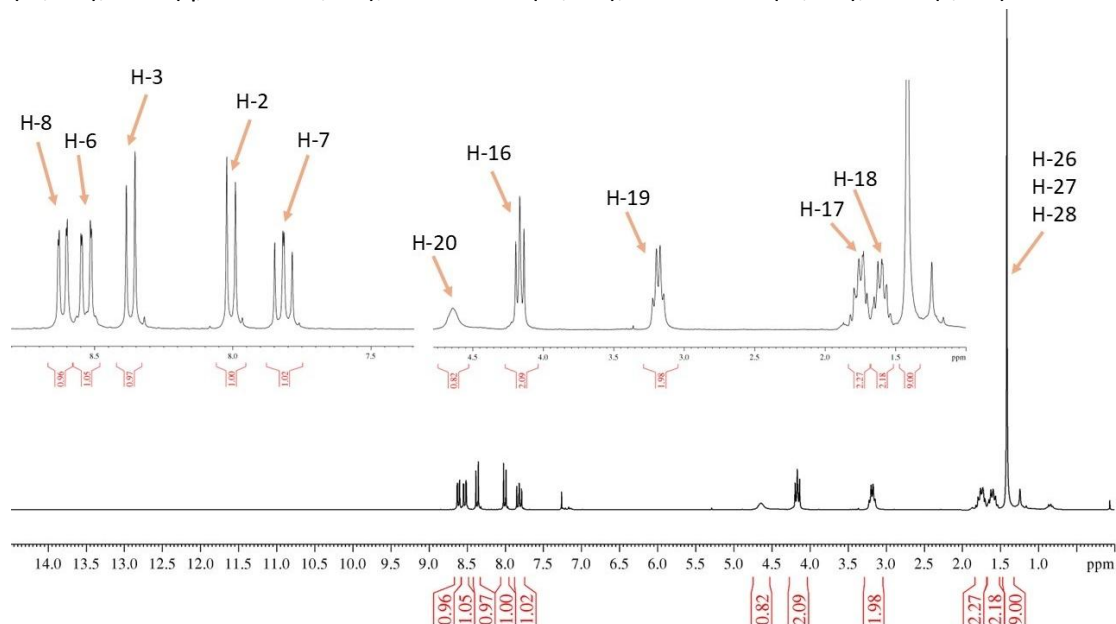
Ένωση **4a**: (4-(6-βρωμο-1,3-διοξο-1H-βενζο[de]ισοκινολιν-2(3H)-
 υλ)βουτυλ)καρβαμικός τριτ-βουτυλεστέρας

Ποσότητα 284.3 mg, απόδοση 85.5 %

$R_f=0.45$ σε 5% v/v MeOH/CH₂Cl₂

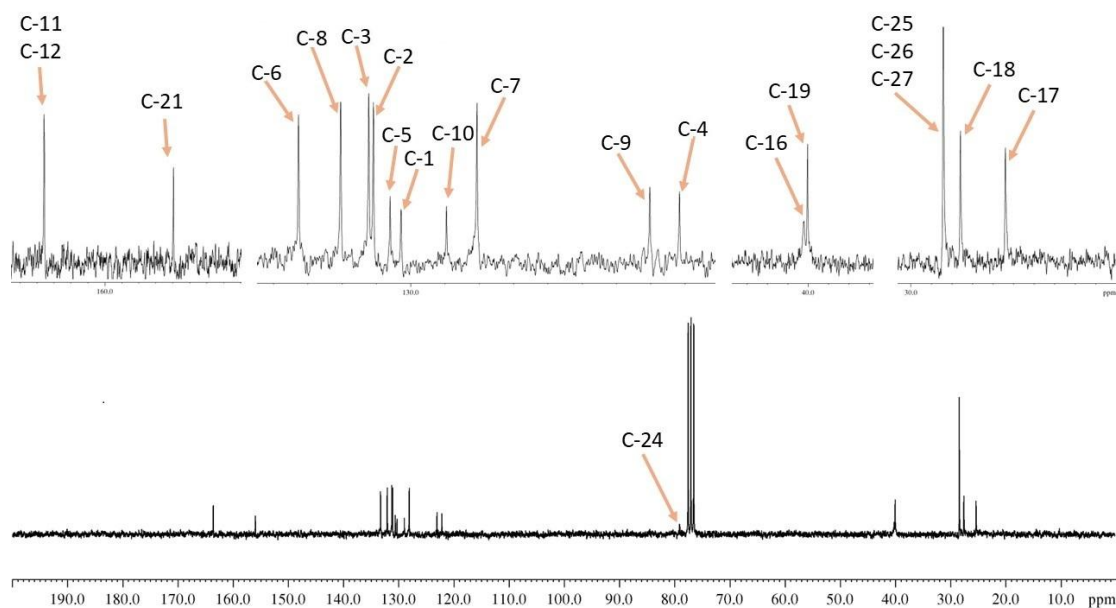
2.7.2 Χαρακτηρισμός της Ένωσης 4a

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.65 (dd, $J = 7.3, 1.2$ Hz, 1H), 8.63 – 8.49 (m, 1H), 8.40 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.85 (dd, $J = 8.5, 7.3$ Hz, 1H), 4.67 (s, 1H), 4.29 – 4.13 (m, 2H), 3.21 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.84 – 1.71 (m, 2H), 1.69 – 1.58 (m, 2H), 1.45 (s, 9H).



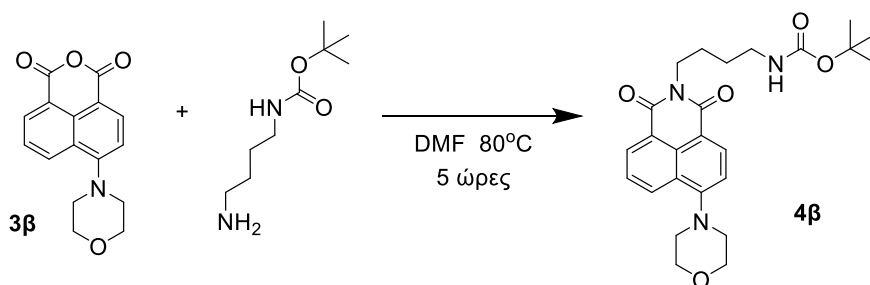
Εικόνα 51: Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης 4a σε CDCl₃-d με μεγεθύνσεις στις κορυφές των πρωτονίων.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 163.58, 155.95, 133.28, 132.05, 131.23, 131.09, 130.60, 130.28, 128.96, 128.07, 123.03, 122.16, 79.09, 40.22, 40.03, 28.42, 27.58, 25.39.



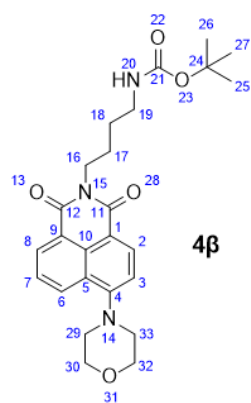
Εικόνα 52: Φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης **4a** σε $\text{CDCl}_3\text{-d}$ με μεγεθύνσεις στις κορυφές των ανθράκων.

2.7.3 Σύνθεση της Ένωσης **4β**



Εικόνα 53: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης **4β**.

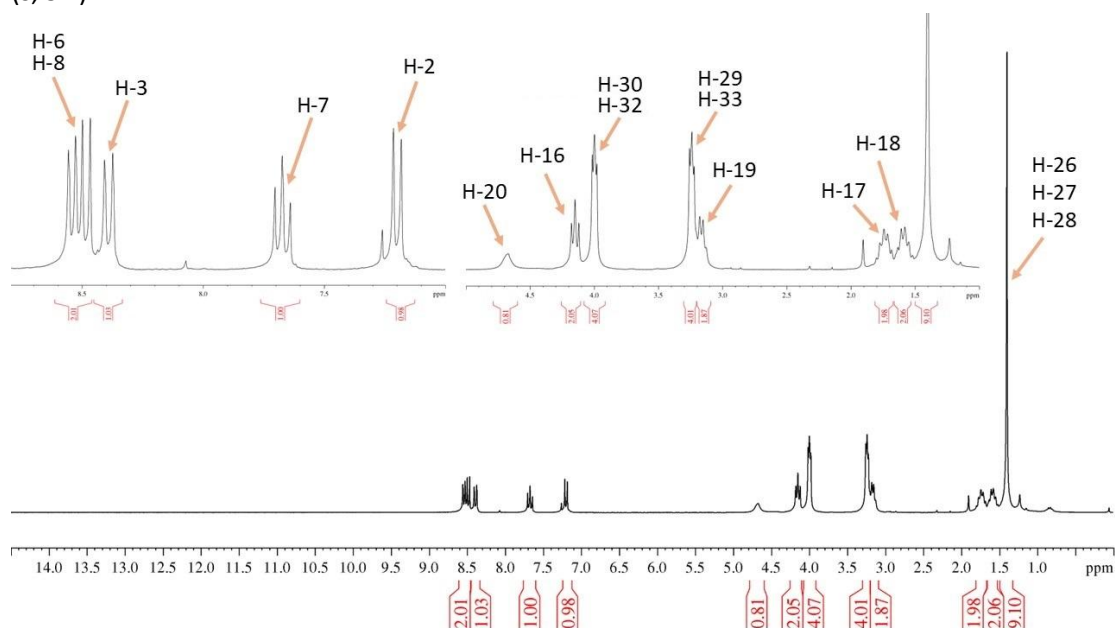
Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται η ένωση **3β** (300mg, 1.059mmol) και 10ml DMF ως διαλύτης. Το μίγμα αναδεύεται για 2 λεπτά και στην συνέχεια προστίθεται η N-(τριτ-βουτοξυκαρβονυλ)-1,4-βουτανοδιαμίνη (188.27μl, 1.2708mmol). Η ανάδευση συνεχίζεται στους 80°C για 5 ώρες. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Μετά την ολοκλήρωσή της, το μίγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου αποχύνεται σε παγωμένο H_2O . Το κίτρινο ίζημα που σχηματίστηκε φιλτράρεται και εκπλένεται αρκετές φορές με παγωμένο H_2O (4 x 15ml). Το στερεό συλλέγεται και ξηραίνεται στην λυοφιλίωση. Η ένωση **4β** χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό ¹¹⁰.



Ένωση **4β**: (4-(6-μορφολινο-1,3-διοξο-1H-βενζο[de]ισοκινολιν-2(3H)-
 υλ)βουτυλ)καρβαμικός τριτ-βουτυλεστέρας
 Ποσότητα 372.9 mg, απόδοση 77.6 %
 $R_f=0.31$ σε 5% v/v MeOH/CH₂Cl₂

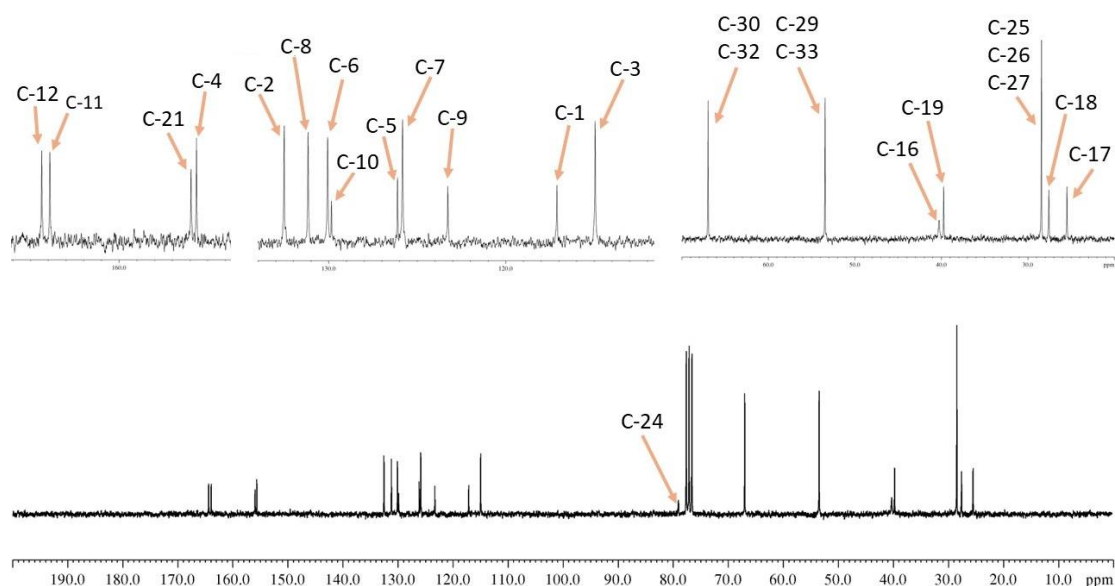
2.7.4 Χαρακτηρισμός της Ένωσης 4β

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.60 – 8.48 (m, 2H), 8.42 (dd, $J = 8.5, 1.3$ Hz, 1H), 7.70 (dd, $J = 8.4, 7.2$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 4.70 (s, 1H), 4.18 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 4.08 – 3.97 (m, 4H), 3.32 – 3.23 (m, 4H), 3.23 – 3.14 (m, 2H), 1.84 – 1.70 (m, 2H), 1.67 – 1.54 (m, 2H), 1.47 (s, 9H).



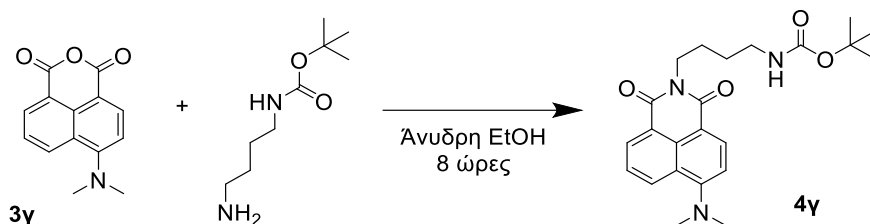
Εικόνα 54: Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης 4β σε CDCl₃-d με μεγεθύνσεις στις κορυφές των πρωτονίων.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 164.36, 163.90, 155.94, 155.63, 132.51, 131.16, 130.06, 129.84, 126.11, 125.82, 123.27, 117.10, 114.94, 79.00, 66.96, 53.44, 40.26, 39.73, 28.42, 27.56, 25.48.



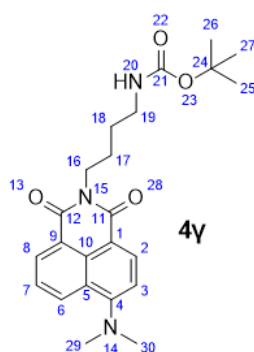
Εικόνα 55: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης **4b** σε $\text{CDCl}_3\text{-d}$ με μεγεθύνσεις στις κορυφές των ανθράκων.

2.7.5 Σύνθεση της Ένωσης **4γ**



Εικόνα 56: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης **4γ**.

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται η ένωση **3γ** (100mg, 0.4558mmol) και 6ml άνυδρης EtOH ως διαλύτης. Το μίγμα αναδεύεται για 10 λεπτά και στην συνέχεια προστίθεται η N-(τριτ-βουτοξυκαρβονυλ)-1,4-βουτανοδιαμίνη (87μl, 0.4144mol). Η ανάδευση συνεχίζεται στους 80°C για 8 ώρες. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Μετά την ολοκλήρωσή της, το μίγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, φιλτράρεται και εκπλένεται με εξάνιο (2 x 10ml). Το ακατέργαστο προϊόν καθαρίζεται με flash χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. Η ένωση **4γ** εκλούστηκε σε ποσοστό 2% MeOH/ CH_2Cl_2 . Ο διαλύτης απομακρύνθηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα δίνοντας πορτοκαλί στερεό^{109,111}.



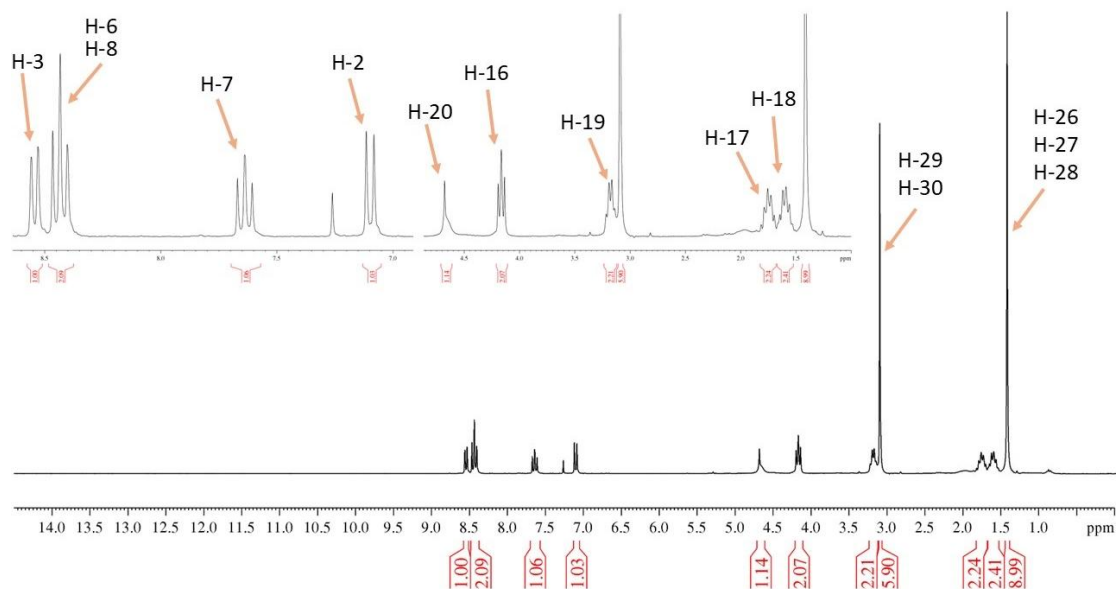
Ένωση **4γ**: (4-(6-(διμεθυλαμινο)-1,3-διοξο-1H-βενζο[de]ισοκινολιν-2(3H)-υλ)βουτυλ)καρβαμικός τριτ-βουτυλεστέρας

Ποσότητα 128.1 mg, απόδοση 68.3 %

$R_f=0.33$ σε 5% v/v MeOH/ CH_2Cl_2

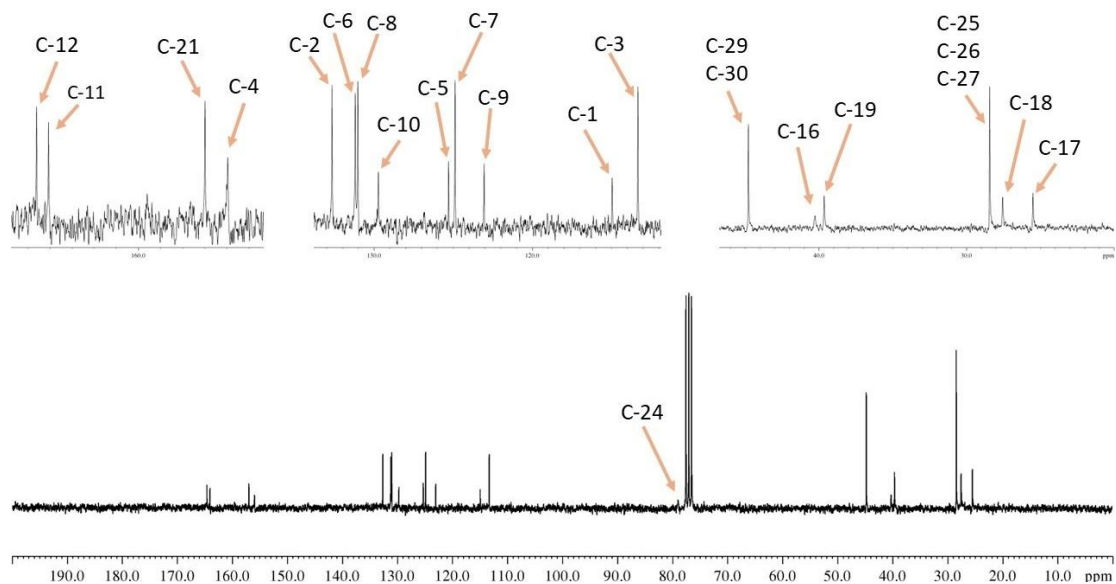
2.7.6 Χαρακτηρισμός της Ένωσης 4γ

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.57 (dd, $J = 7.3, 1.2$ Hz, 1H), 8.46 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.67 (dd, $J = 8.5, 7.3$ Hz, 1H), 7.13 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 4.71 (s, 1H), 4.19 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.21 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.12 (s, 6H), 1.77 (q, $J = 7.6, 7.2$ Hz, 2H), 1.62 (dq, $J = 12.3, 6.3, 5.9$ Hz, 2H), 1.44 (s, 9H).



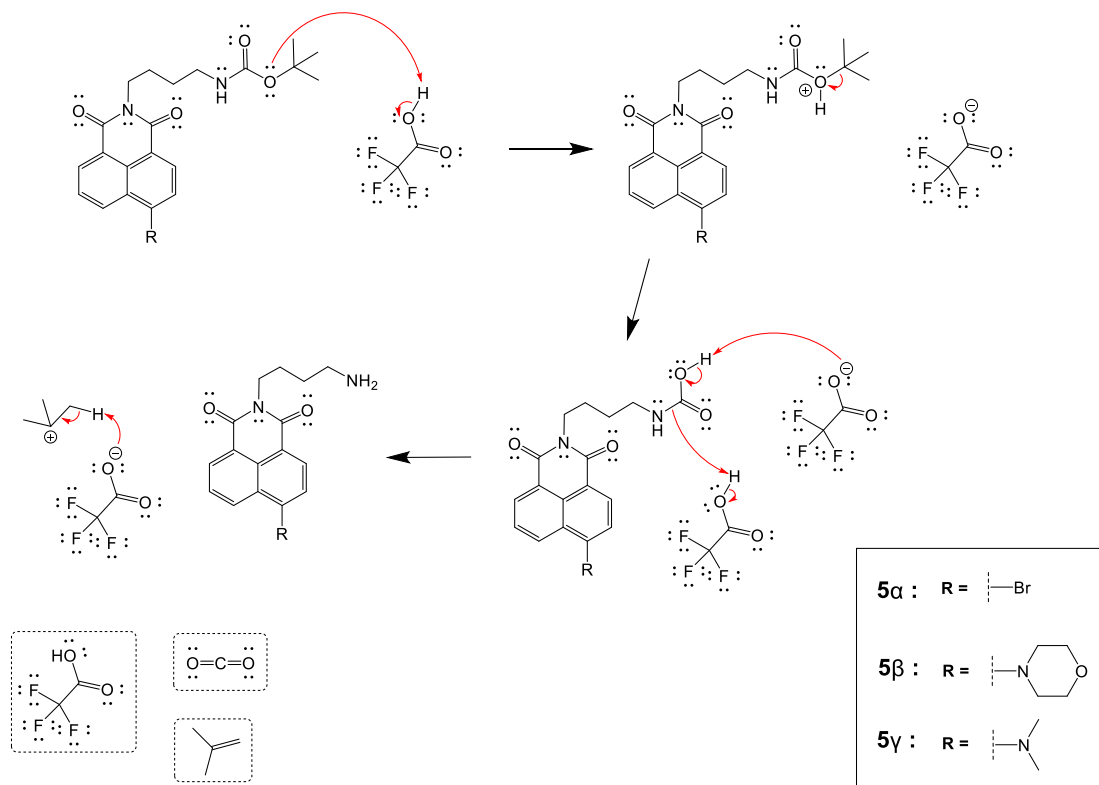
Εικόνα 57: Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 4γ σε CDCl_3 -d με μεγεθύνσεις στις κορυφές των πρωτονίων.

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 164.61, 164.07, 156.99, 155.96, 132.66, 131.19, 131.03, 130.24, 129.73, 125.29, 124.88, 123.04, 114.95, 113.32, 78.95, 44.77, 40.26, 39.64, 28.42, 27.54, 25.49.



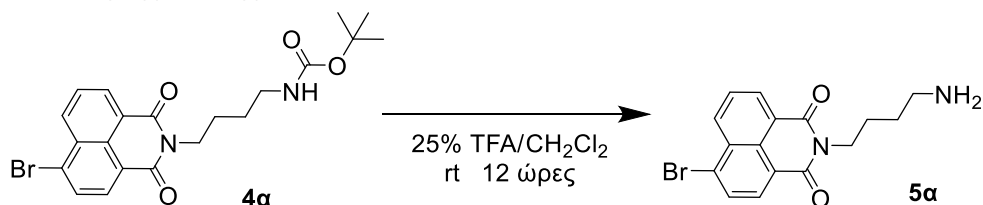
Εικόνα 58: Φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης 4γ σε CDCl_3 -d με μεγεθύνσεις στις κορυφές των ανθράκων.

2.8 Σύνθεση των Ενώσεων 5



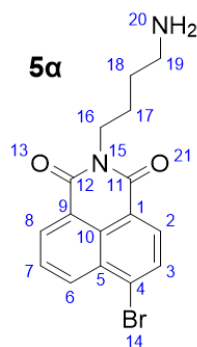
Εικόνα 59: Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού των ενώσεων 5α, 5β και 5γ.

2.8.1 Σύνθεση της Ένωσης 5α



Εικόνα 60: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης 5α.

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται 200mg (0.4470 mmol) της ένωσης **4α** με 3ml CH_2Cl_2 . Μόλις διαλυθεί πλήρως η ένωση, προστίθεται αργά και το διάλυμα 5ml TFA σε 12ml CH_2Cl_2 . Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες και ελέγχεται με TLC για την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Στην συνέχεια η αντίδραση αποχύνεται σε 100ml διαλύματος NaOH συγκέντρωσης 2M. Το διφασικό σύστημα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη και μετά από έντονη ανακίνηση η οργανική στοιβάδα συλλέγεται. Η υδατική στοιβάδα πλένεται με CH_2Cl_2 (2 x 10ml). Οι οργανικές φάσεις ξηραίνονται με Na_2SO_4 και συμπυκνώνονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το υπόλειμμα λυοφιλιώνεται, δίνοντας την ένωση **5α** ως κίτρινο-λευκό στερεό ¹¹².



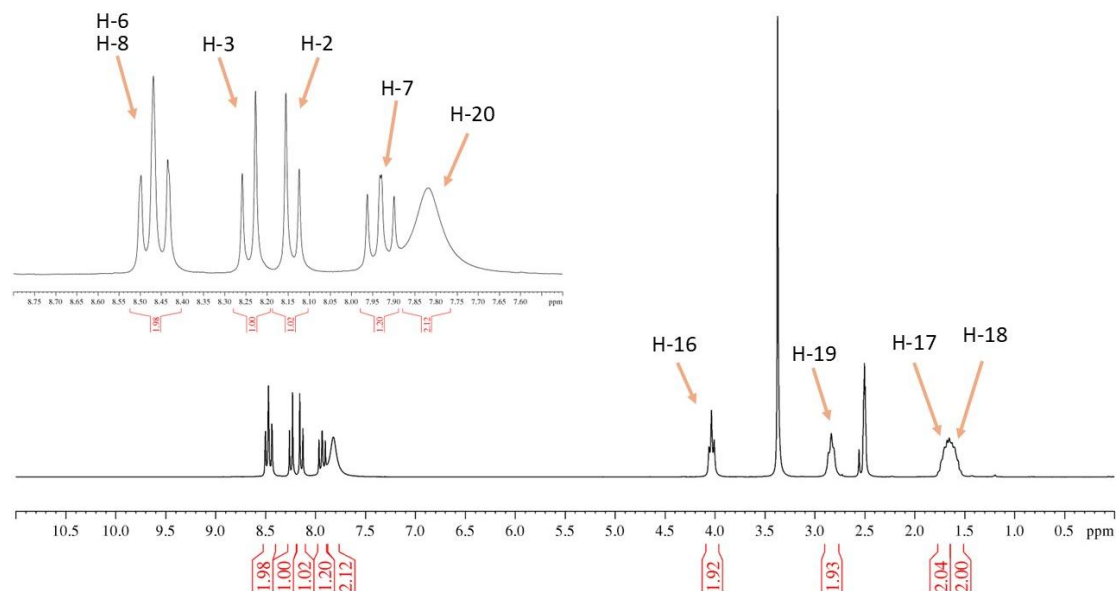
Ένωση **5a**: 2-(4-αμινοβουτυλ)-6-βρωμο-1H-βενζο[de]ισοκινολινο-1,3(2H)-διόνη

Ποσότητα 132.7 mg, απόδοση 85.5 %

R_f=0.4 σε 15% v/v MeOH/CH₂Cl₂ και εμφάνιση σε διάλυμα νινυδρίνης.

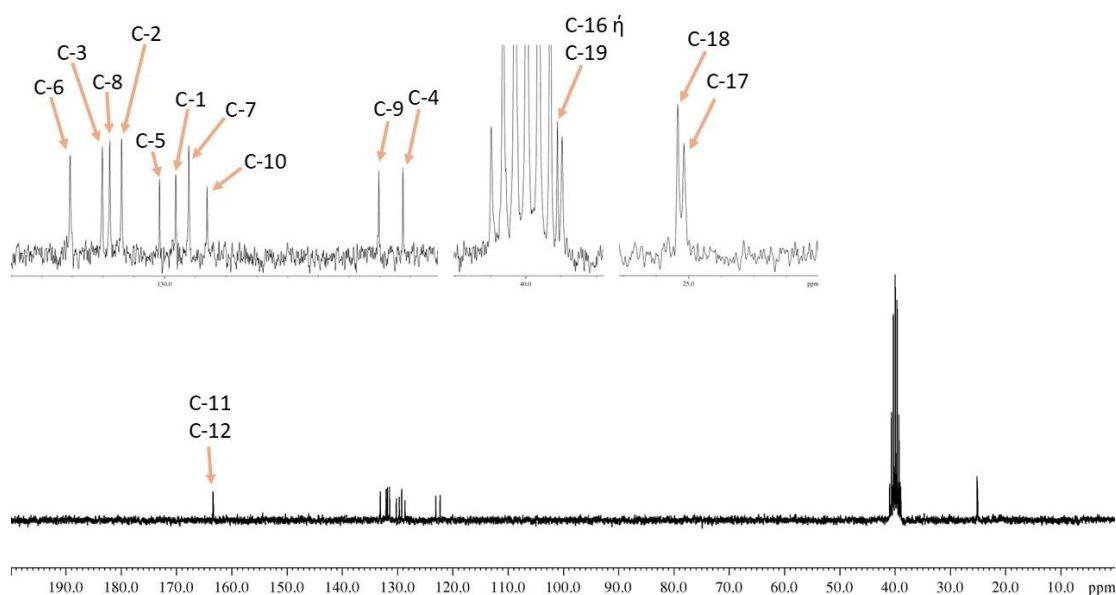
2.8.2 Χαρακτηρισμός της Ένωσης 5a

¹H NMR (250 MHz, DMSO) δ: 8.55 – 8.41 (m, 2H), 8.26 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.94 (dd, *J* = 8.5, 7.3 Hz, 1H), 7.83 (s, 2H), 4.04 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.85 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.78 – 1.53 (m, 4H).



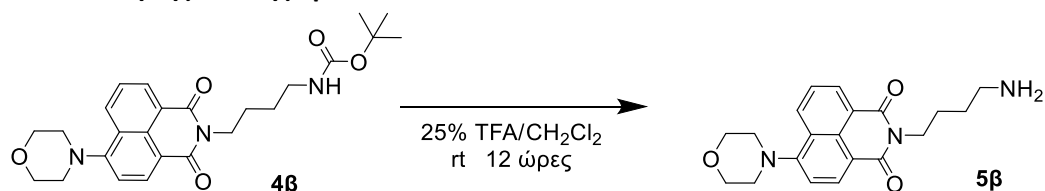
Εικόνα 61: Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης 5a σε DMSO-*d*₆ με μεγεθύνσεις στις κορυφές των πρωτονίων.

¹³C NMR (63 MHz, DMSO) δ: 163.34, 163.29, 133.07, 132.02, 131.78, 131.40, 130.16, 129.64, 129.21, 128.62, 123.03, 122.25, 39.11, 25.17, 25.08.



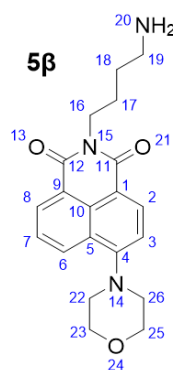
Εικόνα 62: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης **5a** σε DMSO-d_6 με μεγεθύνσεις στις κορυφές των ανθράκων.

2.8.3 Σύνθεση της Ένωσης **5β**



Εικόνα 63: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης **5β**.

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται 200mg (0.409 mmol) της ένωσης **4β** με 3ml CH_2Cl_2 . Μόλις διαλυθεί πλήρως η ένωση, προστίθεται αργά και το διάλυμα 5ml TFA σε 12ml CH_2Cl_2 . Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες και ελέγχεται με TLC για την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Στην συνέχεια η αντίδραση αποχύνεται σε 100ml διαλύματος NaOH συγκέντρωσης 2M Το διφασικό σύστημα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη και μετά από έντονη ανακίνηση η οργανική στοιβάδα συλλέγεται. Η υδατική στοιβάδα πλένεται με CH_2Cl_2 (4 x 10ml). Οι οργανικές φάσεις ξηραίνονται με Na_2SO_4 και συμπυκνώνονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το υπόλειμμα λυοφιλώνεται, δίνοντας την ένωση **5β** ως κίτρινο στερεό ¹¹².



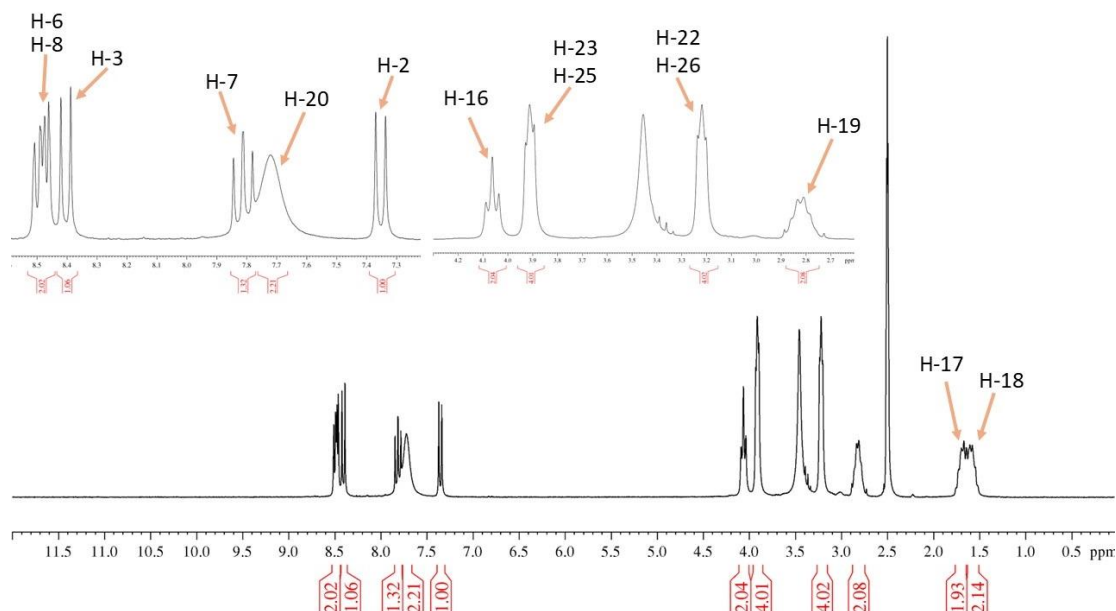
Ένωση **5β**: 2-(4-αμινοβουτυλ)-6-μορφολινο-1H-βενζο[de]ισοκινολινο-1,3(2H)-διόνη

Ποσότητα 136.1 mg, απόδοση 87.3 %

$R_f=0.36$ σε 15% v/v $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ και εμφάνιση σε διάλυμα νινυδρίνης.

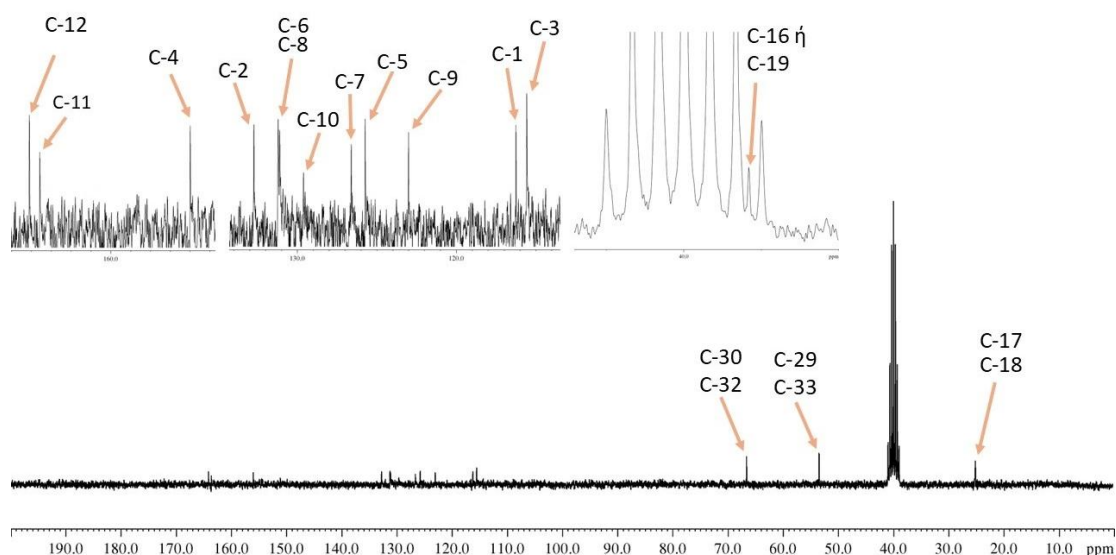
2.8.4 Χαρακτηρισμός της Ένωσης 5β

^1H NMR (250 MHz, DMSO) δ : 8.55 – 8.45 (m, 2H), 8.42 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.83 (dd, J = 8.4, 7.4 Hz, 1H), 7.73 (s, 2H), 7.37 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.08 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.92 (dd, J = 5.8, 3.3 Hz, 4H), 3.23 (dd, J = 5.9, 3.2 Hz, 4H), 2.84 (h, J = 6.2 Hz, 2H), 1.78 – 1.52 (m, 4H).



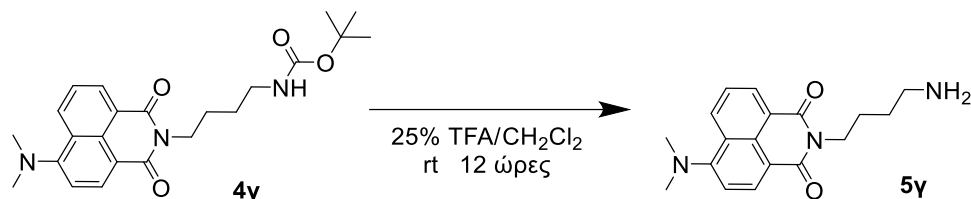
Εικόνα 64: Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 5b σε DMSO- d_6 με μεγεθύνσεις στις κορυφές των πρωτονίων.

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO) δ : 164.11, 163.57, 155.99, 132.73, 131.21, 131.08, 129.62, 126.63, 125.74, 122.97, 116.24, 115.56, 66.65, 53.51, 39.16, 25.19.



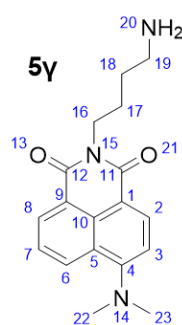
Εικόνα 65: Φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης 5b σε DMSO- d_6 με μεγεθύνσεις στις κορυφές των ανθράκων.

2.8.5 Σύνθεση της Ένωσης 5γ



Εικόνα 66: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης 5γ.

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται 100mg (0.2430 mmol) της ένωσης **4γ** με 2ml CH₂Cl₂. Μόλις διαλυθεί πλήρως η ένωση, προστίθεται αργά και το διάλυμα 3ml TFA σε 7ml CH₂Cl₂. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες και ελέγχεται με TLC για την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Στην συνέχεια η αντίδραση αποχύνεται σε 70ml διαλύματος NaOH συγκέντρωσης 2M. Το διφασικό σύστημα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη και μετά από έντονη ανακίνηση η οργανική στοιβάδα συλλέγεται. Η υδατική στοιβάδα εκπλένεται με CH₂Cl₂ (2 x 10ml). Οι οργανικές φάσεις ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το υπόλειμμα λυοφιλιώνεται, δίνοντας την ένωση **5γ** ως πορτοκαλί-κόκκινο στερεό ¹¹².



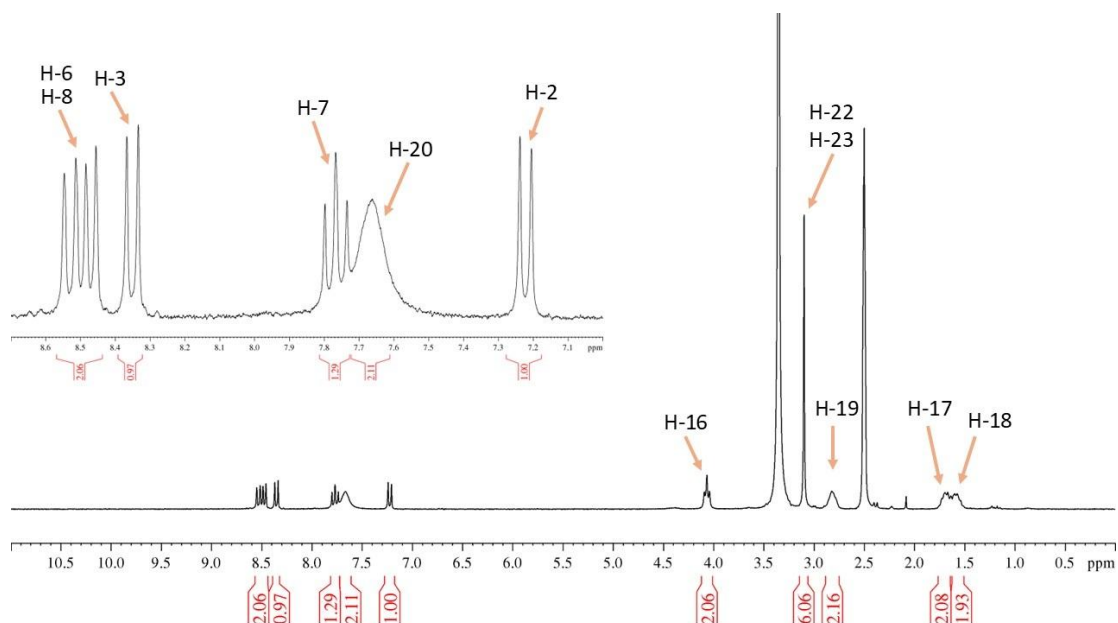
Ένωση **5γ**: 2-(4-αμινοβουτυλ)-6-(διμεθυλαμινο)-1H-βενζο[de]ισοκινολινο-1,3(2H)-διόνη

Ποσότητα 59.8 mg, απόδοση 79.1 %

R_f=0.36 σε 15% v/v MeOH/CH₂Cl₂ και εμφάνιση σε διάλυμα νινυδρίνης.

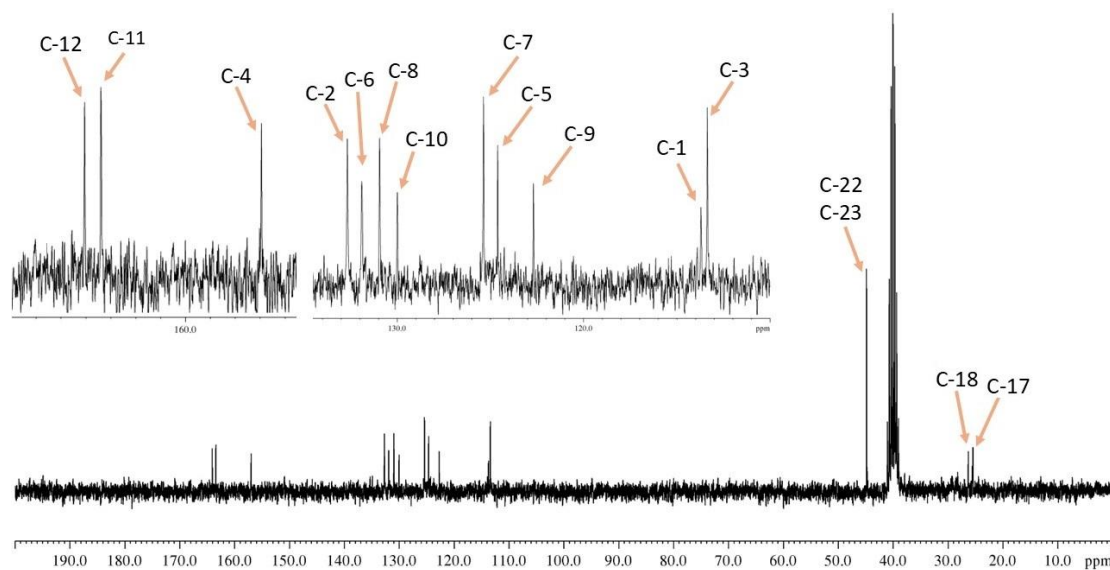
2.8.6 Χαρακτηρισμός της Ένωσης 5γ

¹H NMR (250 MHz, DMSO) δ: 8.51 (ddd, *J* = 14.5, 7.9, 1.2 Hz, 2H), 8.36 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.78 (dd, *J* = 8.5, 7.3 Hz, 1H), 7.68 (s, 2H), 7.23 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.08 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.11 (s, 6H), 2.83 (s, 2H), 1.77 – 1.50 (m, 4H).



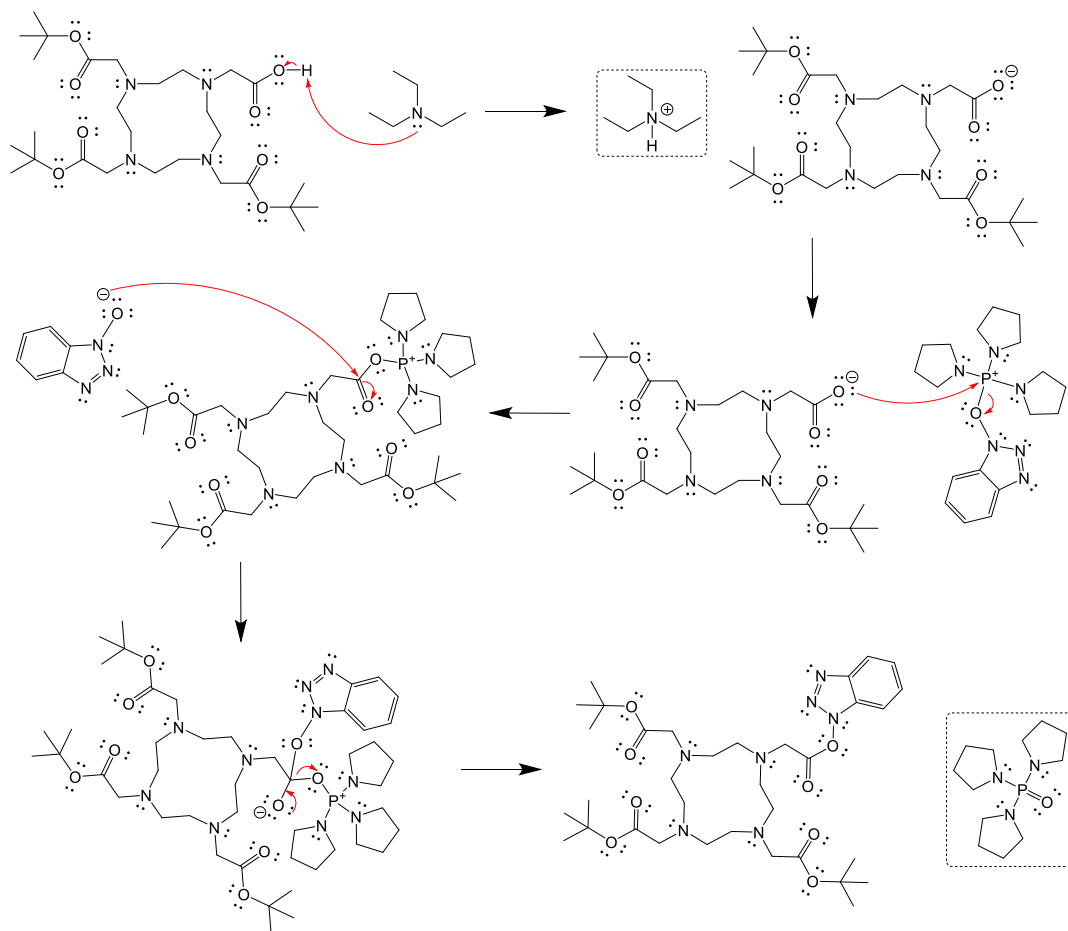
Εικόνα 67: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 5γ σε DMSO-d_6 με μεγεθύνσεις στις κορυφές των πρωτονίων.

$^{13}\text{C NMR}$ (63 MHz, DMSO) δ : 164.05, 163.39, 156.94, 132.67, 131.90, 130.94, 129.99, 125.36, 124.60, 122.69, 113.69, 113.36, 44.81, 26.25, 25.42.

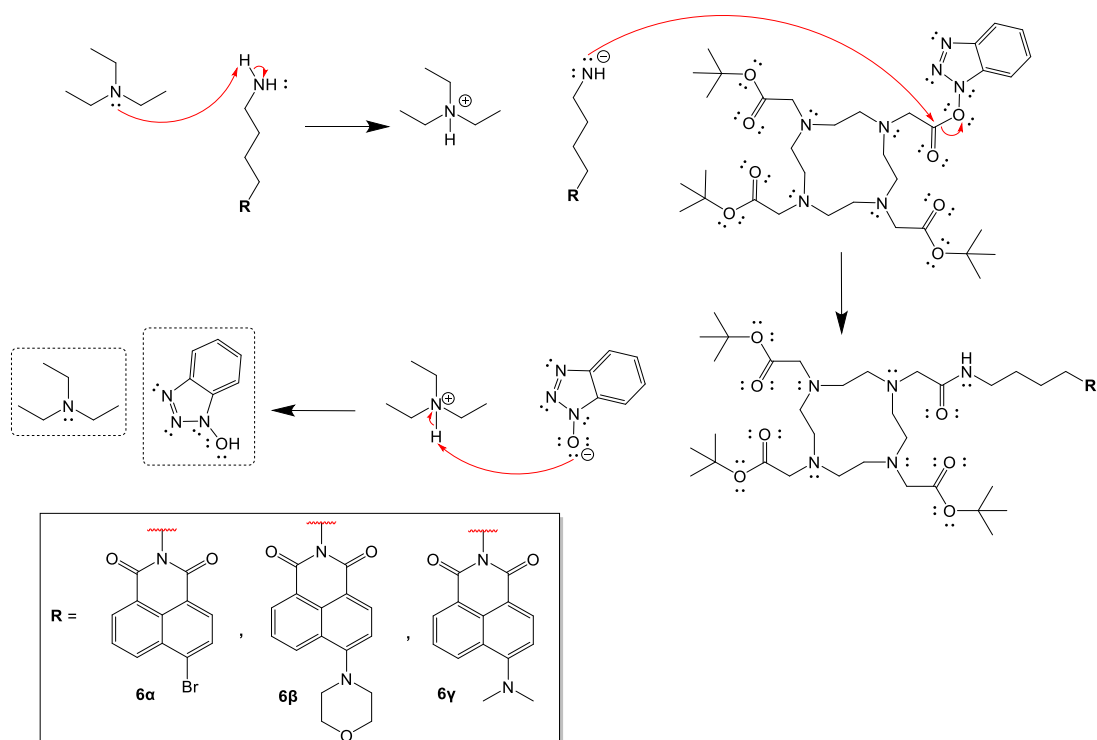


Εικόνα 68: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης 5γ σε DMSO-d_6 με μεγεθύνσεις στις κορυφές των ανθράκων.

2.9 Σύνθεση των Ενώσεων 6

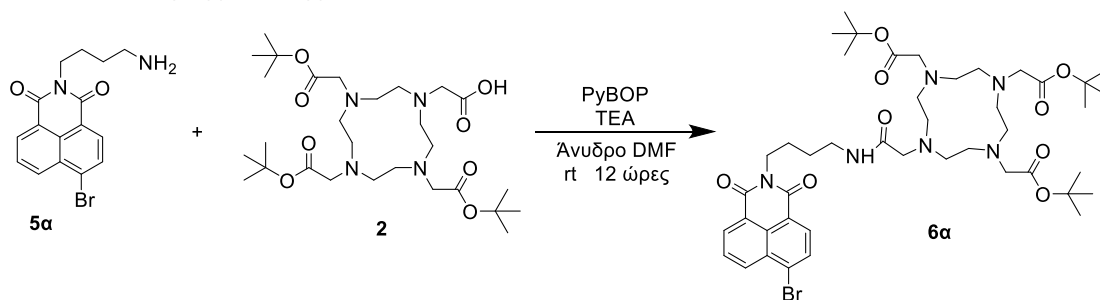


Εικόνα 69: Πιθανός μηχανισμός ενεργοποίησης της ένωσης 2 για την δημιουργία αμιδικού δεσμού.



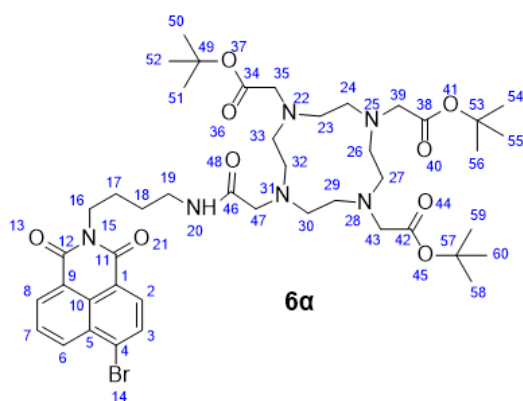
Εικόνα 70: Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού των ενώσεων 6α, 6β και 6γ.

2.9.1 Σύνθεση της Ένωσης 6α



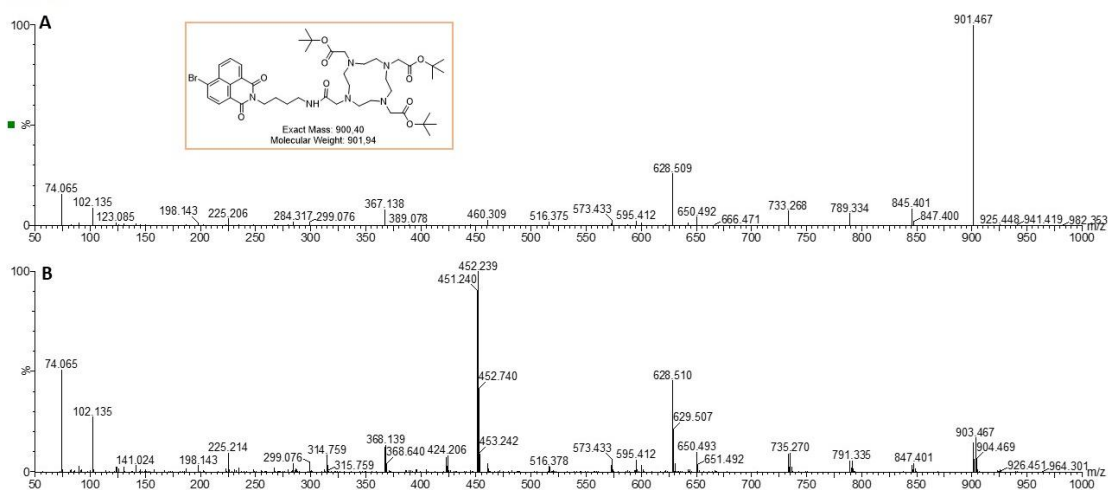
Εικόνα 71: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης 6α.

Σε γυάλινο φιαλίδιο προστίθενται η ένωση **2** (30mg, 0.0523mmol), το αντιδραστήριο σύζευξης PyBOP (7.2mg, 0.0628mmol) και 1ml άνυδρου DMF. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Σε μια ξηρή σφαιρική φιάλη προστίθενται η ένωση **5α** (27.2mg, 0.0785mmol), η TEA (73μl, 0.5237mmol) και 2ml άνυδρου DMF. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και στην συνέχεια γίνεται η προσθήκη του διαλύματος της ενεργοποιημένης ένωσης **2**. Η ανάδευση συνεχίζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες υπό ατμόσφαιρα αζώτου και ελέγχεται με TLC για την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Η ύπαρξη του επιθυμητού προϊόντος επιβεβαιώνεται και με φασματομετρία μάζας. Στην συνέχεια η αντίδραση αποχύνεται σε 10ml H₂O και μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη. Στην συνέχεια ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂ (3 x 10ml). Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα της ένωσης **6α** χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.



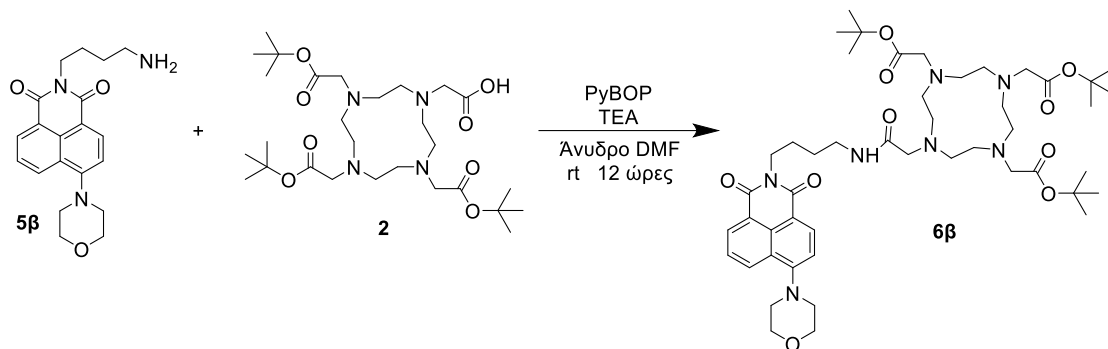
Ένωση **6α**: Τρι-τερτ-βουτυλ 2,2',2''-(10-(2-((4-(6-βρωμο-1,3-διοξο-1H-βενζο[de]ισοκινολιν-2(3H)-υλ)βουτυλ)αμινο)-2-οξοαιθυλ)-1,4,7,10-τετρααζακυκλοωδεκαν-1,4,7-τριυλ)τρι-οξοϊκό

R_f=0.57 σε 5% v/v MeOH/CH₂Cl₂ και εμφάνιση σε διάλυμα υπερμαγγανικού καλίου.



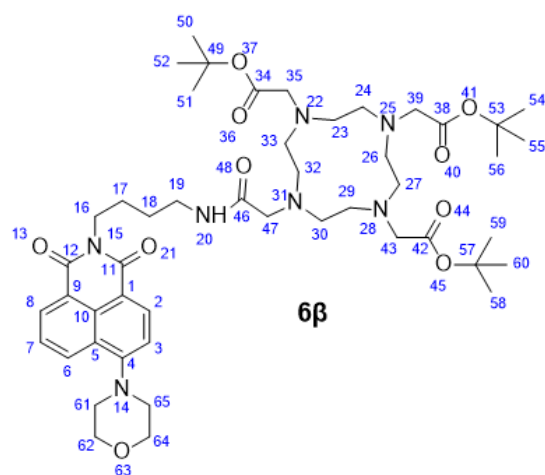
Εικόνα 72: (B) Φάσμα ESI-MS και (A) φάσμα ESI-MS με TOF Transform της ένωσης 6α με το επιθυμητό m/z : $[M+H]^+=901.467$.

2.9.2 Σύνθεση της Ένωσης 6β

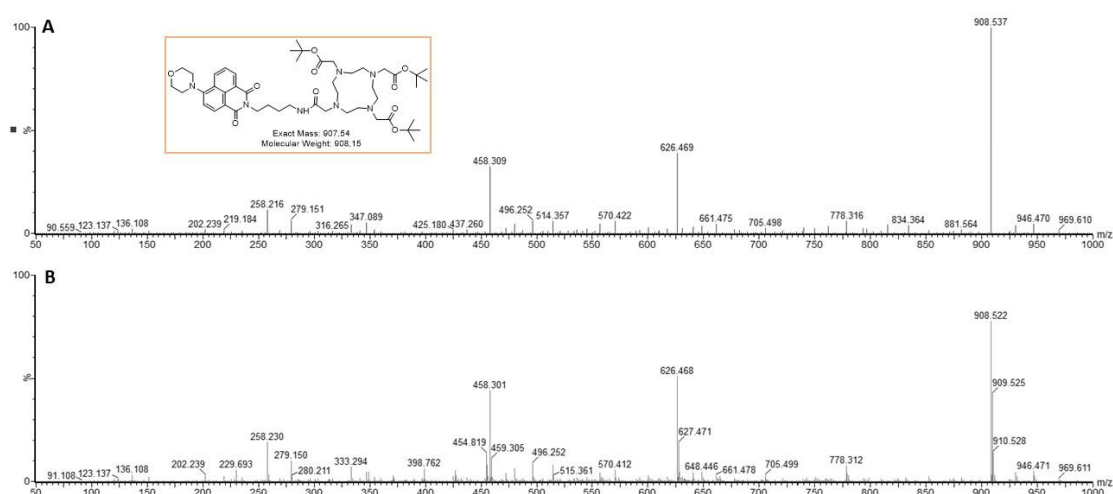


Εικόνα 73: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης 6β.

Σε γυάλινο φιαλίδιο προστίθενται η ένωση **2** (30mg, 0.0523mmol), το αντιδραστήριο σύζευξης PyBOP (7.2mg, 0.0628mmol) και 1ml άνυδρου DMF. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Σε μια ξηρή σφαιρική φιάλη προστίθενται η ένωση **5β** (28.3mg, 0.0785mmol), η TEA (73μl, 0.5237mmol) και 1.5ml άνυδρου DMF. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και στην συνέχεια γίνεται η προσθήκη του διαλύματος της ενεργοποιημένης ένωσης **2**. Η ανάδευση συνεχίζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες υπό ατμόσφαιρα αζώτου και ελέγχεται με TLC για την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Η ύπαρξη του επιθυμητού προϊόντος επιβεβαιώνεται και με φασματομετρία μάζας. Στην συνέχεια η αντίδραση αποχύνεται σε 10ml H₂O και μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη. Στην συνέχεια ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂ (3 x 10ml). Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα της ένωσης **6β** χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

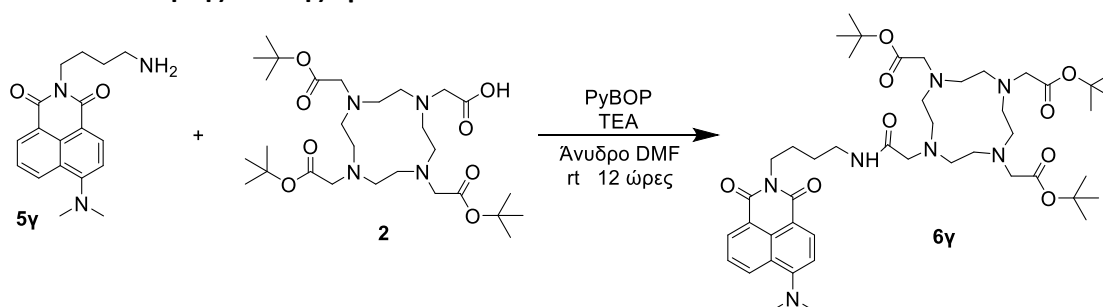


Ένωση **6β**: Τρι-τερτ-βουτυλ 2,2',2''-(10-(2-((4-(6-μορφολινο-1,3-διοξο-1H-βενζο[de]ισοκινολιν-2(3H)-υλ)βουτυλ)αμινο)-2-οξοαιθυλ)-1,4,7,10-τετρααζακυκλοωδεκαν-1,4,7-τριυλ)τρι-οξοξικό
 $R_f=0.56$ σε 5% v/v MeOH/CH₂Cl₂ και εμφάνιση σε διάλυμα υπερμαγνητικού καλίου.



Εικόνα 74: (B) Φάσμα ESI-MS και (A) φάσμα ESI-MS με TOF Transform της ένωσης **6β** με το επιθυμητό m/z : $[M+H]^+=908.537$.

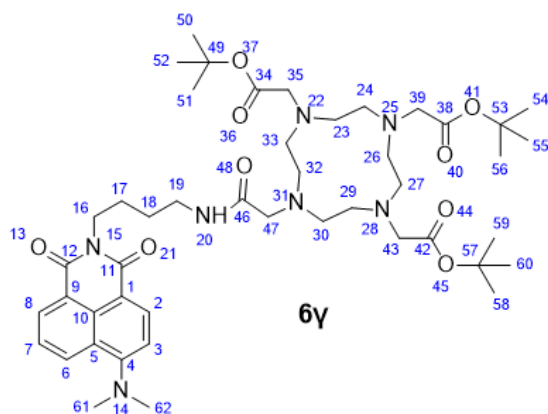
2.9.3 Σύνθεση της Ένωσης **6γ**



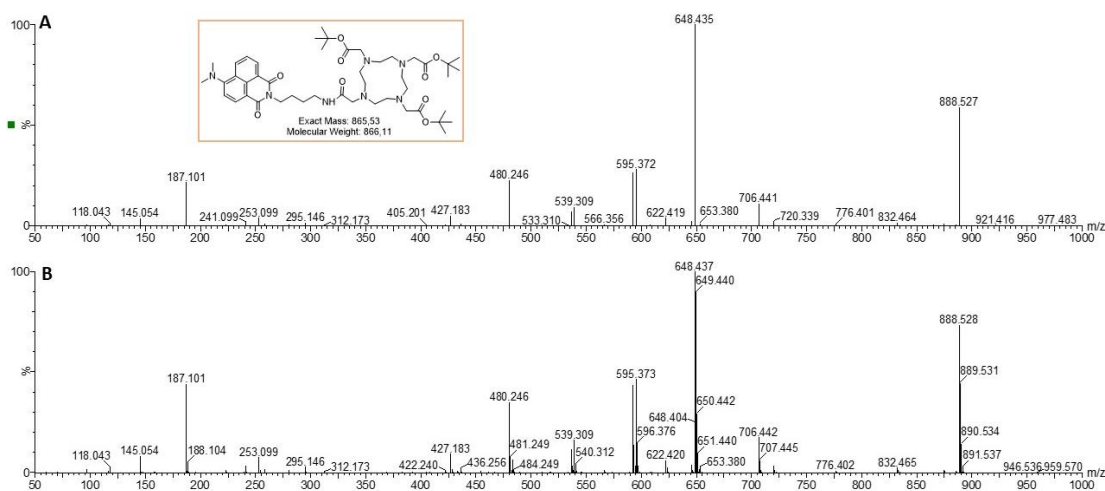
Εικόνα 75: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης **6γ**.

Σε γυάλινο φιαλίδιο προστίθενται η ένωση **2** (28mg, 0.0488mmol), το αντιδραστήριο σύζευξης PyBOP (6.8mg, 0.0586mmol) και 1ml άνυδρου DMF. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Σε μια ξηρή σφαιρική φιάλη προστίθενται η ένωση **5γ** (22.8mg, 0.0733mmol), η TEA (68.2μl, 0.4888mmol) και 1.5ml άνυδρου DMF. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και στην συνέχεια γίνεται η προσθήκη του διαλύματος της ενεργοποιημένης ένωσης **2**. Η ανάδευση συνεχίζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες υπό ατμόσφαιρα αζώτου και ελέγχεται

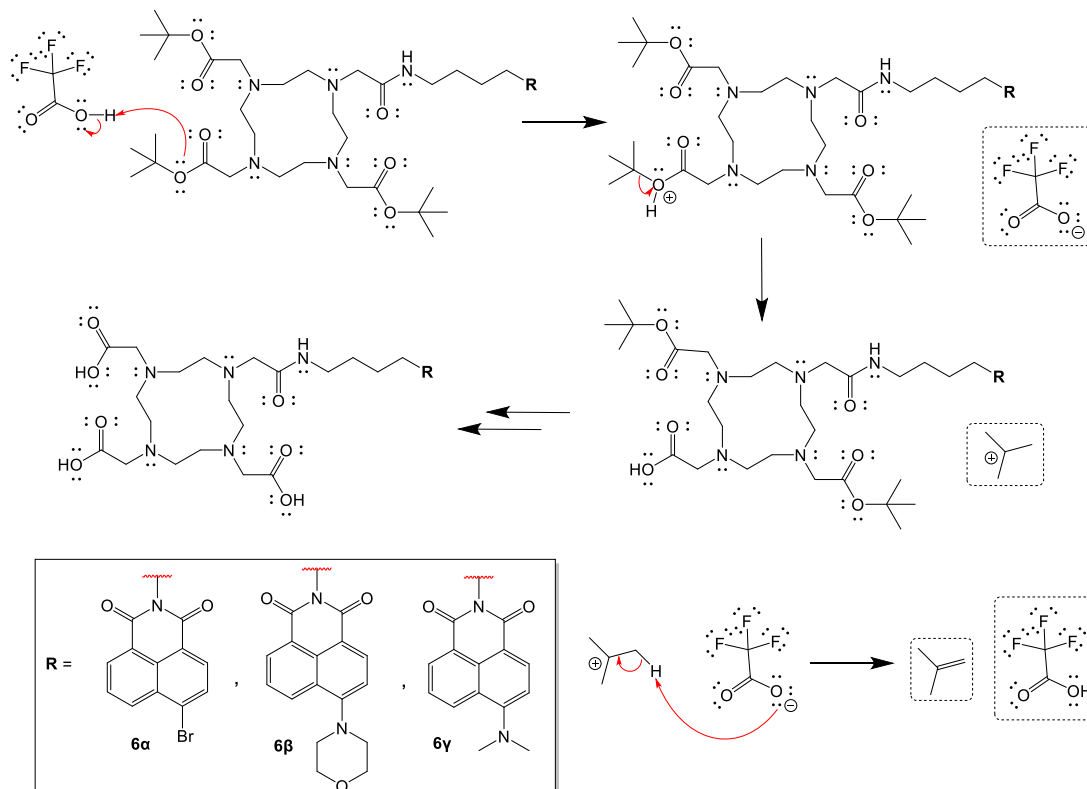
με TLC για την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Η ύπαρξη του επιθυμητού προϊόντος επιβεβαιώνεται και με φασματομετρία μάζας. Στην συνέχεια η αντίδραση αποχύνεται σε 10ml H₂O και μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη. Στην συνέχεια ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂ (3 x 10ml). Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα της ένωσης **6γ** χρησιμοποιείται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.



Ένωση **6γ**: Τρι-τερτ-βουτυλ 2,2',2''-(10-(2-((4-(6-διμεθυλαμινο-1,3-διοξο-1H-βενζο[de]ισοκινολιν-2(3H)-υλ)βουτυλ)αμινο)-2-οξοαιθυλ)-1,4,7,10-τετρααζακυκλοδωδεκαν-1,4,7-τριυλ)τρι-οξοξικό
R_f=0.56 σε 5% v/v MeOH/CH₂Cl₂ και εμφάνιση σε διάλυμα υπερμαγγανικού καλίου.

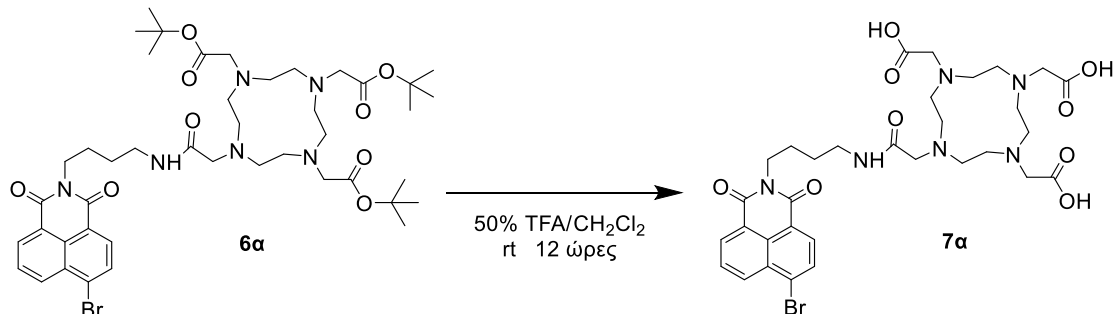


2.10 Σύνθεση των Ενώσεων 7



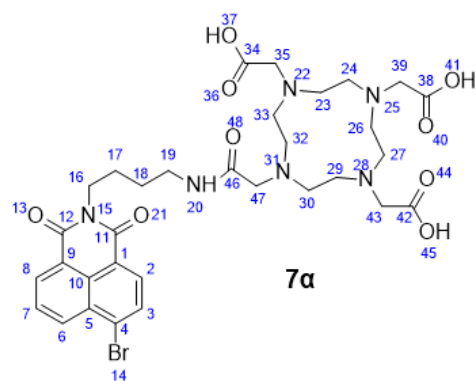
Εικόνα 77: Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού των τελικών ενώσεων 7α, 7β και 7γ.

2.10.1 Σύνθεση της Ένωσης 7α



Εικόνα 78: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης 7α.

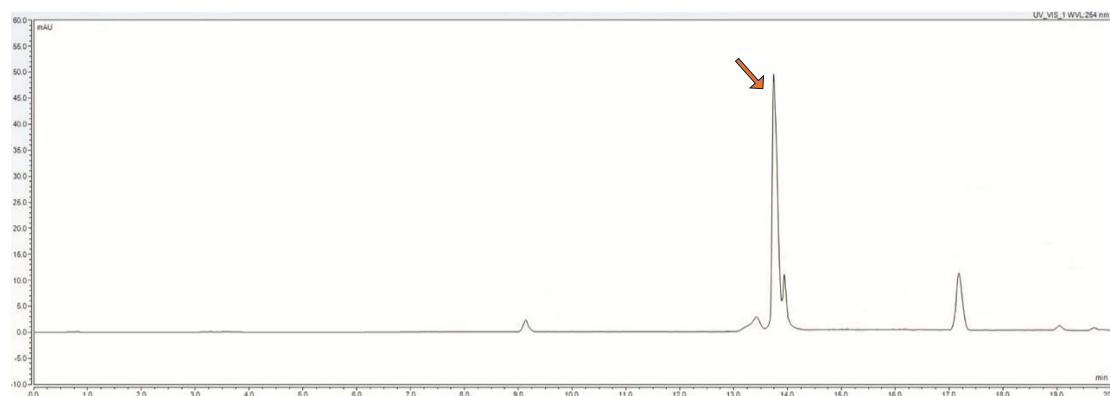
Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται το μίγμα της ένωσης **6α** με 5ml CH_2Cl_2 . Μόλις διαλυθεί πλήρως η ένωση, προστίθεται αργά και το διάλυμα 5ml TFA σε 5ml CH_2Cl_2 . Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 ώρες και ελέγχεται με TLC για την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Στην συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό ελαττωμένη πίεση και το μίγμα την αντίδρασης επαναδιαλύεται σε 2ml H_2O . Ακολουθούν εκπλύσεις με CH_2Cl_2 (2 x 5ml) και η υδατική στοιβάδα λυοφιλώνεται. Τέλος, το ακατέργαστο μίγμα της αντίδρασης διαλύεται σε 2.5ml H_2O + 0.1% TFA και καθαρίζεται με ημιπροπαρασκευαστική HPLC. Το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε είναι από A:95%/B:5% έως A:0%/B:100% όπου A: H_2O + 0.1% TFA και B: MeCN + 0.1% TFA, με σταθερή ροή 3.0 mL/min για χρόνο 20 λεπτά. Η ένωση 7α εκλούστηκε στα 13.8 λεπτά και μετά από συμπύκνωση στον περιστροφικό εξατμιστήρα και λυοφιλίωση, δίνεται η ένωση **7α** ως ανοιχτό γκρι-λευκό στερεό.



Ένωση **7a**: 2,2',2''-(10-(2-((4-(6-βρωμο-1,3-διοξο-1H-βενζο[de]ισοκινολιν-2(3H)-υλ)βουτυλ)αμινο)-2-οξοαιθυλ)-1,4,7,10-τετρααζακυκλοδωδεκαν-1,4,7-τριυλ)τριοξικό οξύ

Ποσότητα 12.7 mg, απόδοση 33.1 %

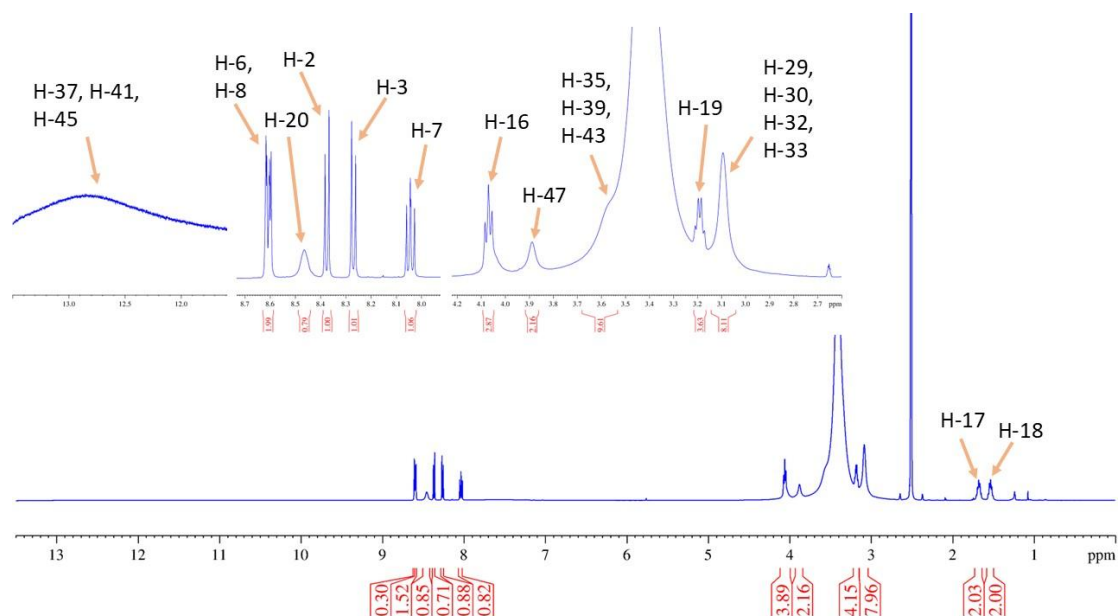
$R_f=0$ (η ένωση 7a μένει στην βάση του TLC) σε 15% ν/ν MeOH/CH₂Cl₂ και εμφάνιση σε διάλυμα υπερμαγνητικού καλίου



Εικόνα 79: Χρωματογράφημα ημιπαρασκευαστικής HPLC της Ένωσης 7a στα 254nm. Η κορυφή με χρόνο κατακράτησης 13.8 min είναι η επιθυμητή.

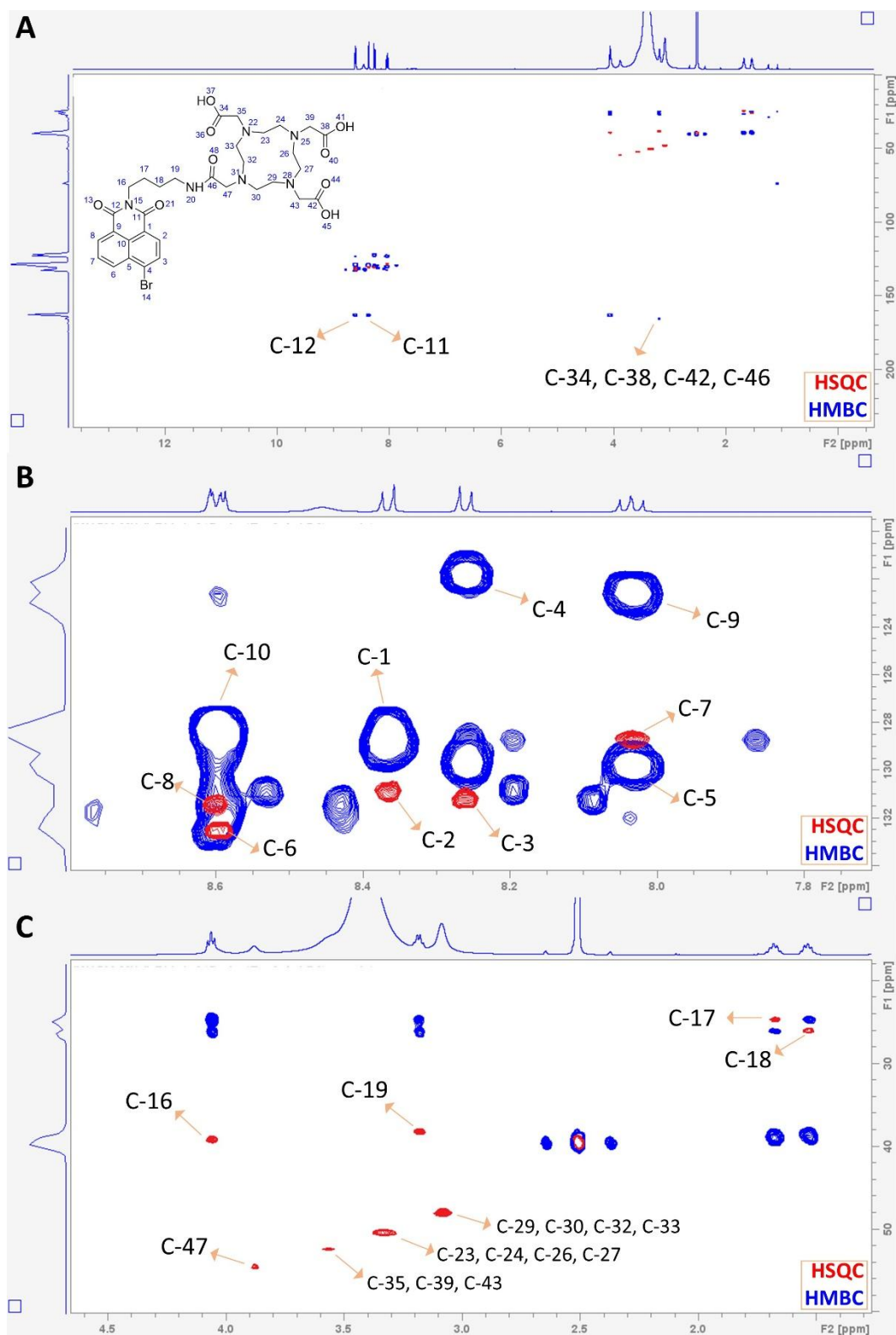
2.10.2 Χαρακτηρισμός της Ένωσης 7a

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ: 12.84 (s, 3H), 8.61 (dt, $J = 8.4, 2.0$ Hz, 2H), 8.49 – 8.43 (m, 1H), 8.38 (dd, $J = 7.9, 1.4$ Hz, 1H), 8.27 (dd, $J = 7.8, 1.5$ Hz, 1H), 8.04 (td, $J = 7.9, 7.2, 1.4$ Hz, 1H), 4.06 (q, $J = 8.2, 7.7$ Hz, 2H), 3.89 (s, 2H), 3.57 (s, 6H), 3.19 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.09 (s, 8H), 1.68 (h, $J = 6.4, 5.7$ Hz, 2H), 1.54 (p, $J = 7.2$ Hz, 2H).

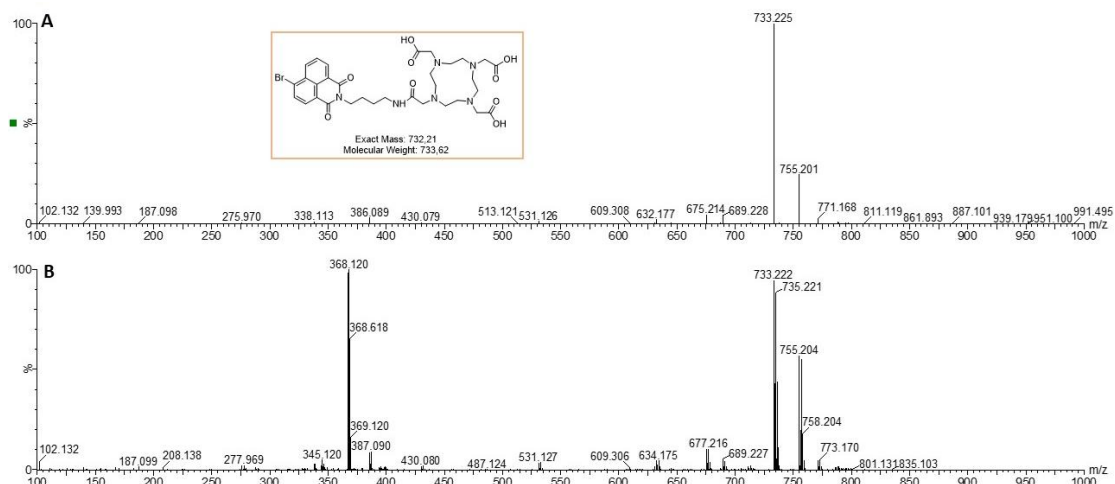


Εικόνα 80: Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 7a σε $\text{DMSO}-d_6$ με μεγεθύνσεις στις κορυφές των πρωτονίων.

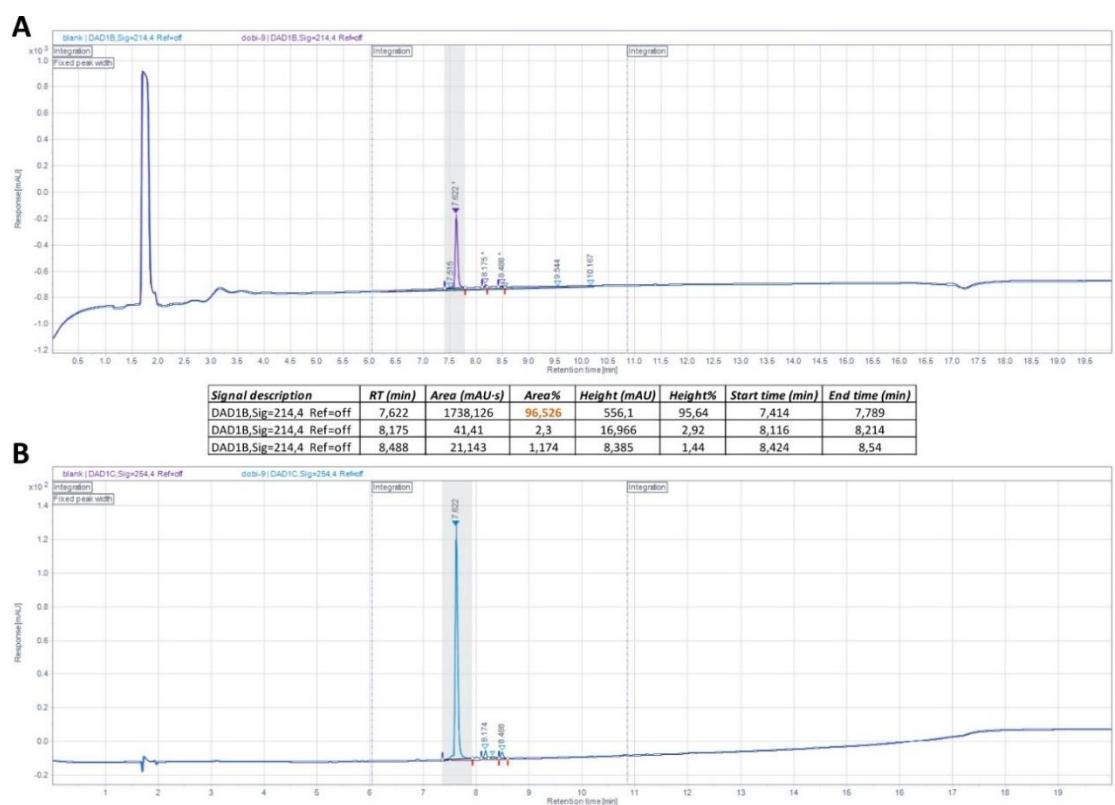
^{13}C δ : 24.63 (C-17), 25.95 (C-18), 38.2 (C-19), 39.13 (C-16), 47.98 (C-29, C-30, C-32, C-33), 50.33 (C-23, C-24, C-26, C-27), 52.32 (C-17), 54.3 (C-47), 121.81 (C-4), 122.47 (C-9), 128.64 (C-10), 128.68 (C-7), 128.7 (C-1), 129.79 (C-5), 130.86 (C-2), 131.18 (C-3), 131.44 (C-8), 132.49 (C-6), 162.85 (C-11, C-12), 165.01 (C-34, C-38, C-42, C-46).



Εικόνα 81: (Α) Υπέρθυση φασμάτων ^1H - ^{13}C HMBC και HSQC της ένωσης 7α σε $\text{DMSO}-d_6$ με μεγέθυνση (Β) στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων και (C) στην περιοχή των αλειφατικών πρωτονίων.

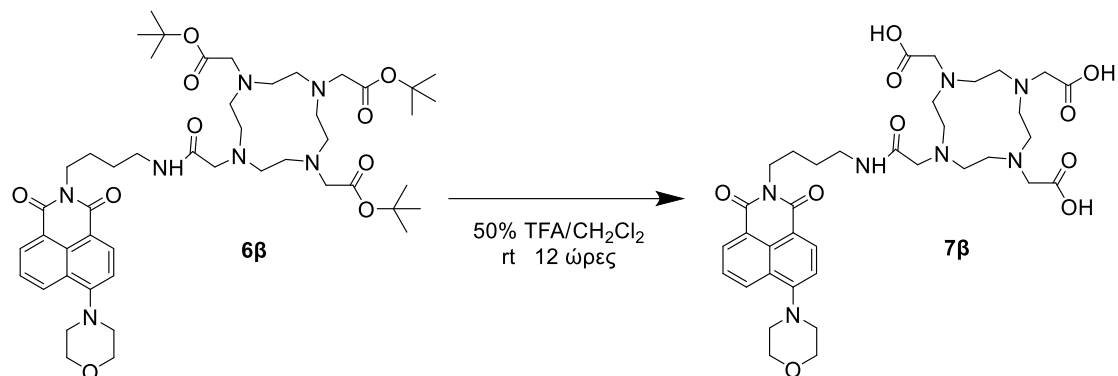


Εικόνα 82: (B) Φάσμα ESI-MS και (A) φάσμα ESI-MS με TOF Transform της ένωσης 7α με το επιθυμητό m/z : $[M+H]^+=733.225$, καθώς και το $[M+Na]^+=755.201$, $[M+K]^+=771.168$.



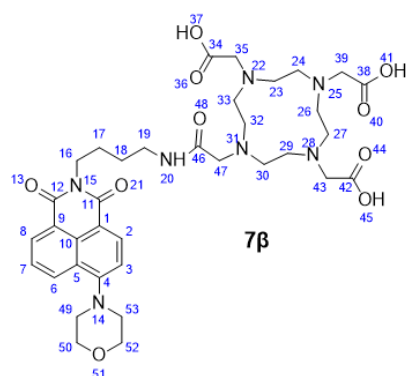
Εικόνα 83: Χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC στα (A) 214nm και (B) 254nm, της ένωσης 7α με υπέρθεση το χρωματογράφημα του τυφλού. Η ένωση έχει χρόνο κατακράτησης 7.622 min και καθαρότητα 96.536%.

2.10.3 Σύνθεση της Ένωσης 7β



Εικόνα 84: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης 7β.

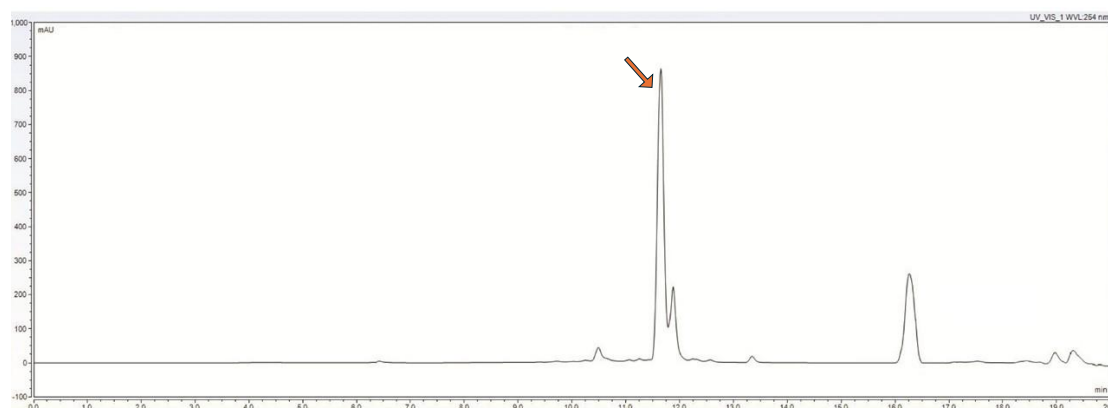
Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται το μίγμα της ένωσης **6β** με 5ml CH_2Cl_2 . Μόλις διαλυθεί πλήρως η ένωση, προστίθεται αργά και το διάλυμα 5ml TFA σε 5ml CH_2Cl_2 . Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 ώρες και ελέγχεται με TLC για την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Στην συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό ελαττωμένη πίεση και το μίγμα την αντίδρασης επαναδιαλύεται σε 2ml H_2O . Ακολουθούν εκπλύσεις με CH_2Cl_2 (2 x 5ml) και η υδατική στοιβάδα λυοφιλώνεται. Τέλος, το ακατέργαστο μίγμα της αντίδρασης διαλύεται σε 2.5ml H_2O + 0.1% TFA και καθαρίζεται με ημιπροπαρασκευαστική HPLC. Το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε είναι από A:95%/B:5% έως A:0%/B:100% όπου A: H_2O + 0.1% TFA και B: MeCN + 0.1% TFA, με σταθερή ροή 3.0 mL/min για χρόνο 20 λεπτά. Η ένωση 7α εκλούστηκε στα 11.6 λεπτά και μετά από συμπύκνωση στον περιστροφικό εξατμιστήρα και λυοφιλίωση, δίνεται η ένωση **7β** ως κίτρινο στερεό.



Ένωση **7β**: 2,2',2''-(10-(2-((4-(6-μορφολινο-1,3-διοξο-1H-βενζο[de]ισοκινολιν-2(3H)-υλ)βουτυλ)αμινο)-2-οξοαιθυλ)-1,4,7,10-τετρααζακυκλοωδεκαν-1,4,7-τριυλ)τριοξικό οξύ

Ποσότητα 10.2 mg, απόδοση 26.3 %

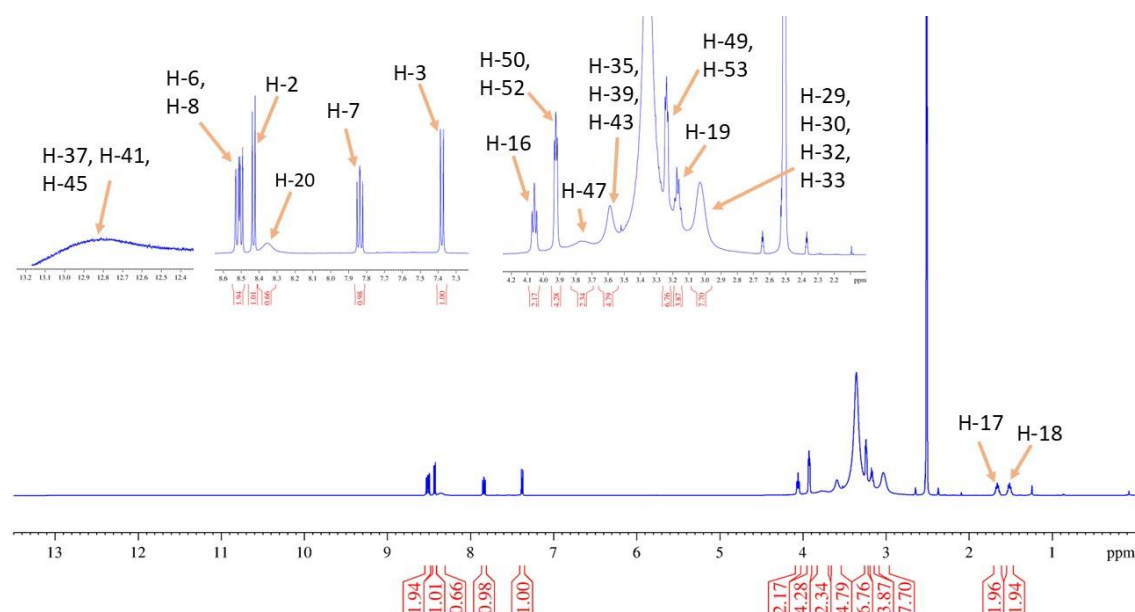
$R_f=0$ (η ένωση 7β μένει στην βάση του TLC) σε 15% v/v MeOH/ CH_2Cl_2 και εμφάνιση σε διάλυμα υπερμαγγανικού καλίου



Εικόνα 85: Χρωματογράφημα ημιπαρασκευαστικής HPLC της Ένωσης 7b στα 254nm. Η κορυφή με χρόνο κατακράτησης 11.6 min είναι η επιθυμητή.

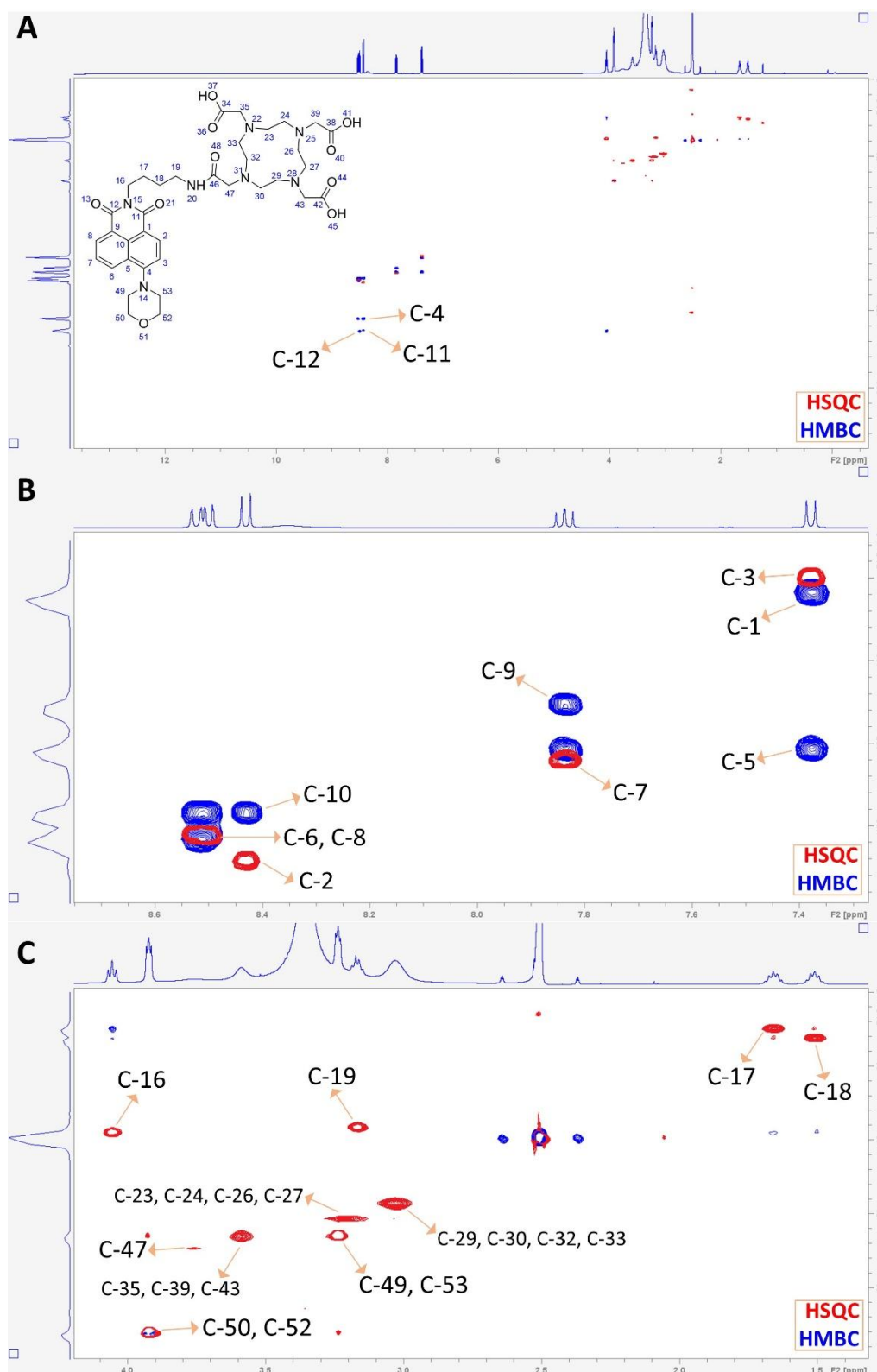
2.10.4 Χαρακτηρισμός της Ένωσης 7b

^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ : 12.82 (s, 3H), 8.55 – 8.47 (m, 2H), 8.43 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.84 (dd, J = 8.5, 7.3 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.06 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.95 – 3.89 (m, 4H), 3.78 (s, 2H), 3.59 (s, 6H), 3.27 – 3.21 (m, 4H), 3.17 (q, J = 6.6 Hz, 2H), 3.03 (s, 8H), 1.66 (h, J = 6.5, 5.9 Hz, 2H), 1.51 (p, J = 7.2 Hz, 2H).

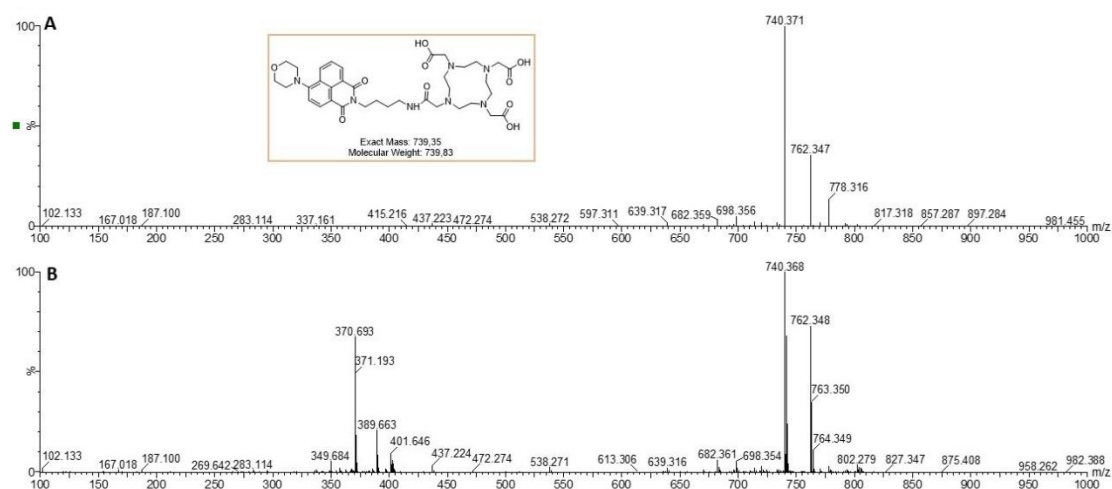


Εικόνα 86: Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 7b σε DMSO- d_6 με μεγεθύνσεις στις κορυφές των πρωτονίων.

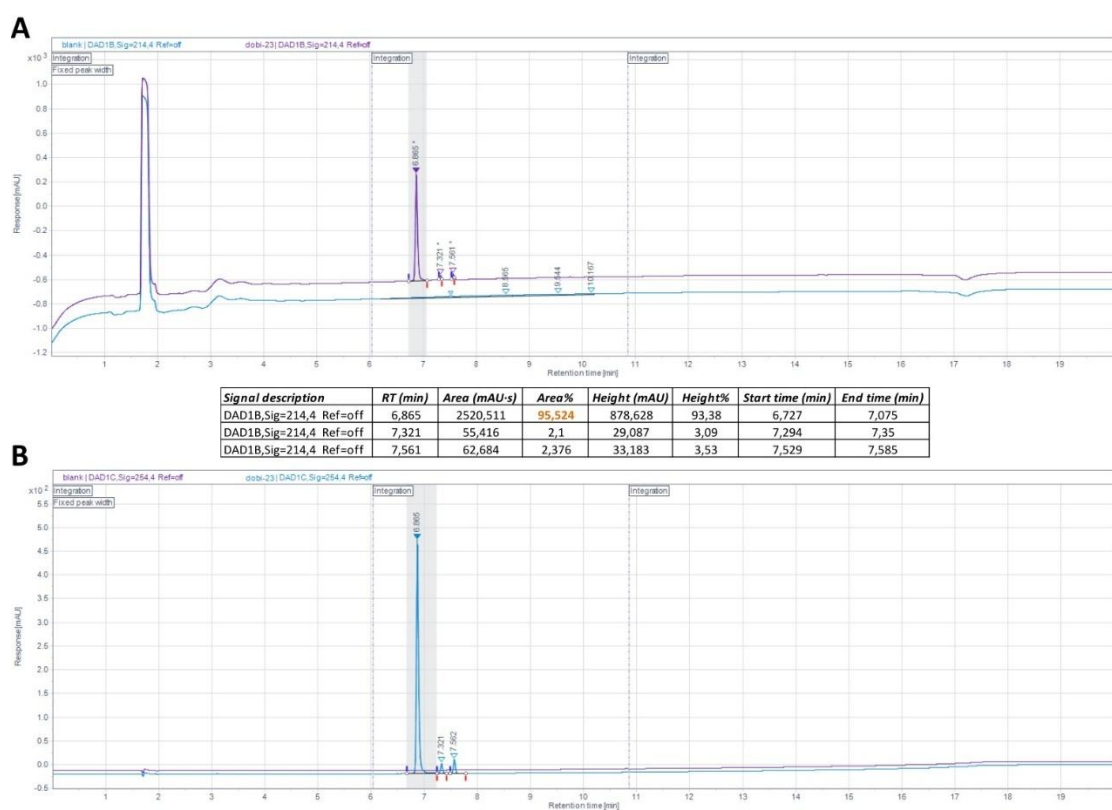
^{13}C δ : 24.9 (C-17), 26.2 (C-18), 38.23 (C-19), 38.88 (C-16), 47.52 (C-29, C-30, C-32, C-33), 50.66 (C-23, C-24, C-26, C-27), 52.8 (C-49, C-53), 53.03 (C-35, C-39, C-43), 54.64 (C-47), 66.0 (C-50, C-52), 114.9 (C-3), 115.94 (C-1), 122.02 (C-9), 125.23 (C-5), 125.92 (C-7), 129.17 (C-10), 130.52 (C-6, C-8), 132.09 (C-2), 155.54 (C-4), 163.03 (C-11), 163.65 (C-12).



Εικόνα 87: (Α) Υπέρθυση φασμάτων ^1H - ^{13}C HMBC και HSQC της ένωσης 7b σε $\text{DMSO}-d_6$ με μεγέθυνση (Β) στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων και (C) στην περιοχή των αλειφατικών πρωτονίων.

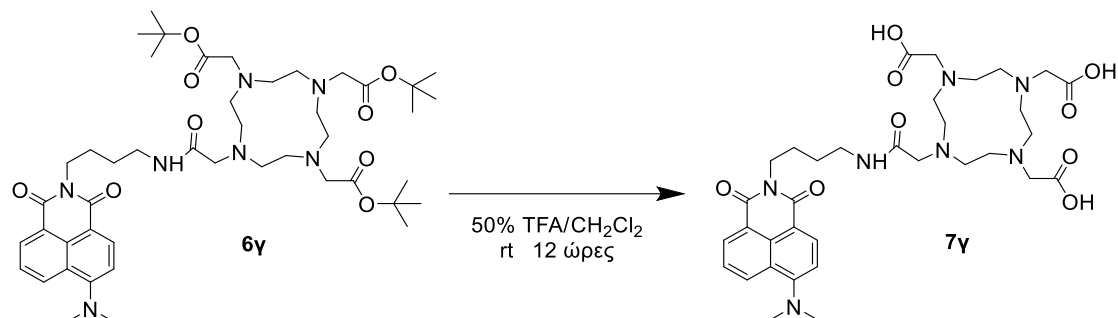


Εικόνα 88: (B) Φάσμα ESI-MS και (A) φάσμα ESI-MS με TOF Transform της ένωσης 7b με το επιθυμητό m/z : $[M+H]^+ = 740.371$, καθώς και το $[M+Na]^+ = 762.347$, $[M+K]^+ = 778.316$.



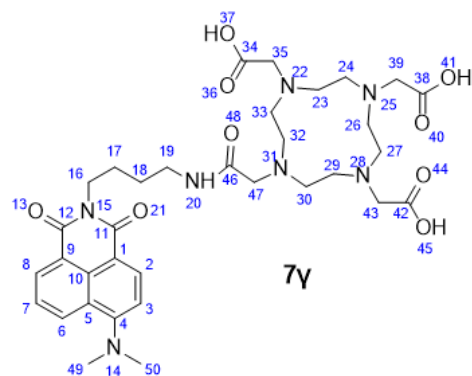
Εικόνα 89: Χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC στα (A) 214nm και (B) 254nm, της ένωσης 7b. Η ένωση έχει χρόνο κατακράτησης 6.865 min και καθαρότητα 95.524%.

2.9.5 Σύνθεση της Ένωσης 7γ

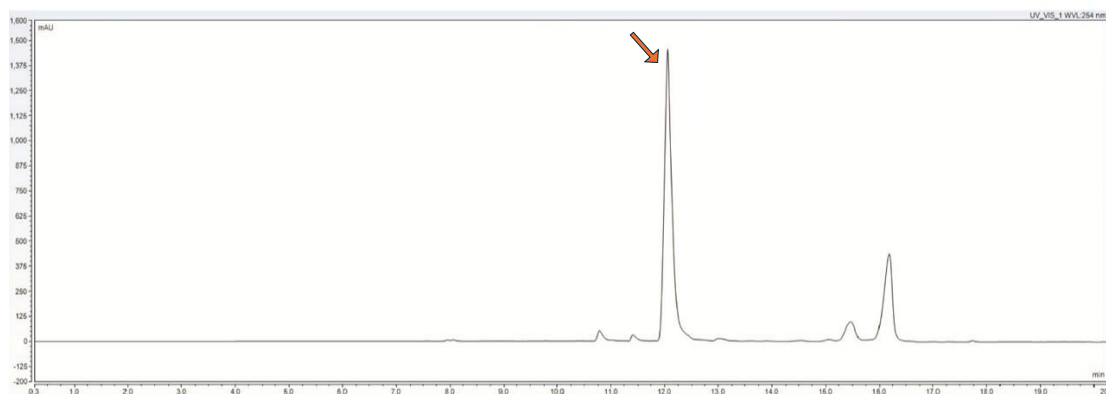


Εικόνα 90: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης 7γ.

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται το μίγμα της ένωσης **6γ** με 5ml CH₂Cl₂. Μόλις διαλυθεί πλήρως η ένωση, προστίθεται αργά και το διάλυμα 5ml TFA σε 5ml CH₂Cl₂. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 ώρες και ελέγχεται με TLC για την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Στην συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό ελαττωμένη πίεση και το μίγμα την αντίδρασης επαναδιαλύεται σε 2ml H₂O. Ακολουθούν εκπλύσεις με CH₂Cl₂ (2 x 5ml) και η υδατική στοιβάδα λυοφιλώνεται. Τέλος, το ακατέργαστο μίγμα της αντίδρασης διαλύεται σε 2.5ml H₂O + 0.1% TFA και καθαρίζεται με ημιπροπαρασκευαστική HPLC. Το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε είναι από A:95%/B:5% έως A:0%/B:100% όπου A: H₂O + 0.1% TFA και B: MeCN + 0.1% TFA, με σταθερή ροή 3.0 mL/min για χρόνο 20 λεπτά. Η ένωση 7γ εκλούστηκε στα 12.1 λεπτά και μετά από συμπύκνωση στον περιστροφικό εξατμιστήρα και λυοφιλίωση, δίνεται η ένωση **7γ** ως κίτρινο στερεό.



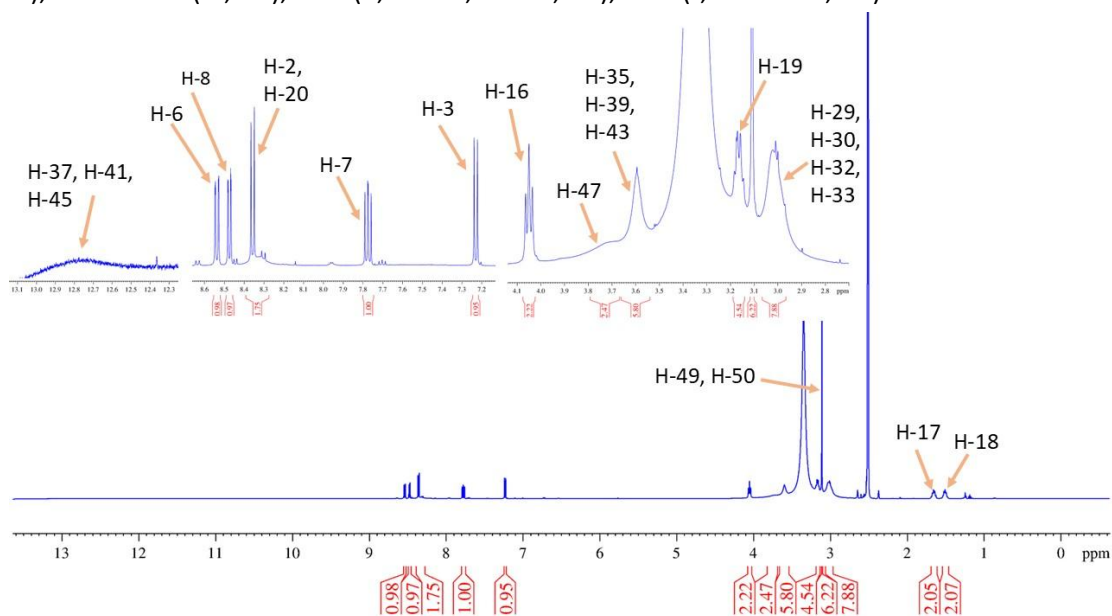
Ένωση **7γ**: 2,2',2''-(10-(2-((4-(6-(διμεθυλαμινο)-1,3-διοξο-1H-βενζο[de]ισοκινολιν-2(3H)-υλ)βουτυλ)αμινο)-2-οξοαιθυλ)-1,4,7,10-τετραζακυκλοδωδεκαν-1,4,7-τριωλ)τριοξικό οξύ
Ποσότητα 16.6 mg, απόδοση 32.5 %
R_f=0 (η ένωση 7γ μένει στην βάση του TLC) σε 15% v/v MeOH/CH₂Cl₂ και εμφάνιση σε διάλυμα υπερμαγγανικού καλίου



Εικόνα 91: Χρωματογράφημα ημιπαρασκευαστικής HPLC της Ένωσης 7γ στα 254nm. Η κορυφή με χρόνο κατακράτησης 12.1 min είναι η επιθυμητή.

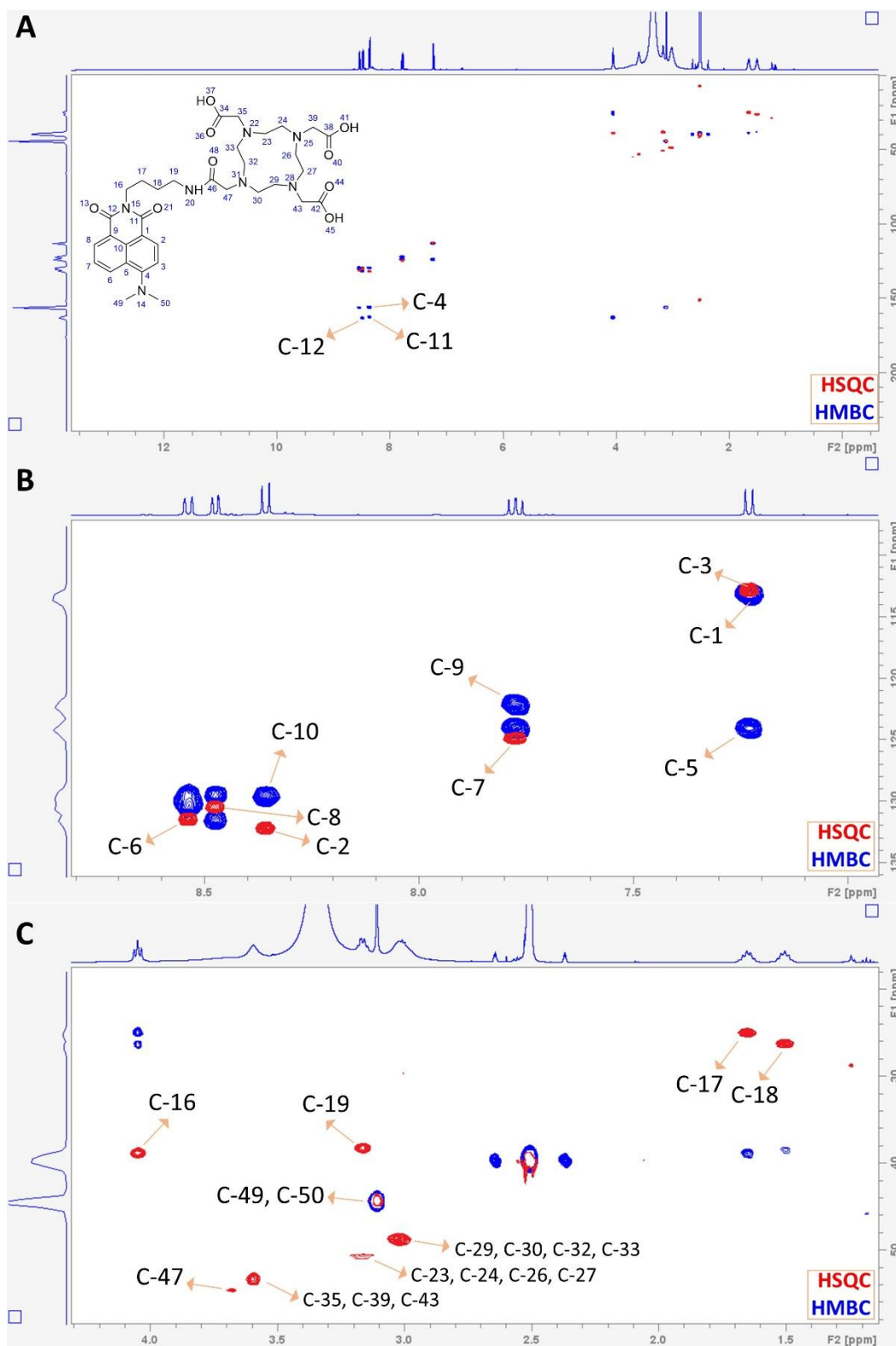
2.10.6 Χαρακτηρισμός της Ένωσης 7γ

^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ : 12.78 (s, 3H), 8.54 (dd, J = 8.5, 1.2 Hz, 1H), 8.47 (dd, J = 7.3, 1.1 Hz, 1H), 8.36 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.77 (dd, J = 8.5, 7.3 Hz, 1H), 7.23 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.05 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.72 (s, 2H), 3.66 – 3.53 (m, 6H), 3.16 (h, J = 5.5, 5.0 Hz, 2H), 3.11 (s, 6H), 3.07 – 2.95 (m, 8H), 1.65 (h, J = 6.5, 6.0 Hz, 2H), 1.50 (t, J = 7.7 Hz, 2H).

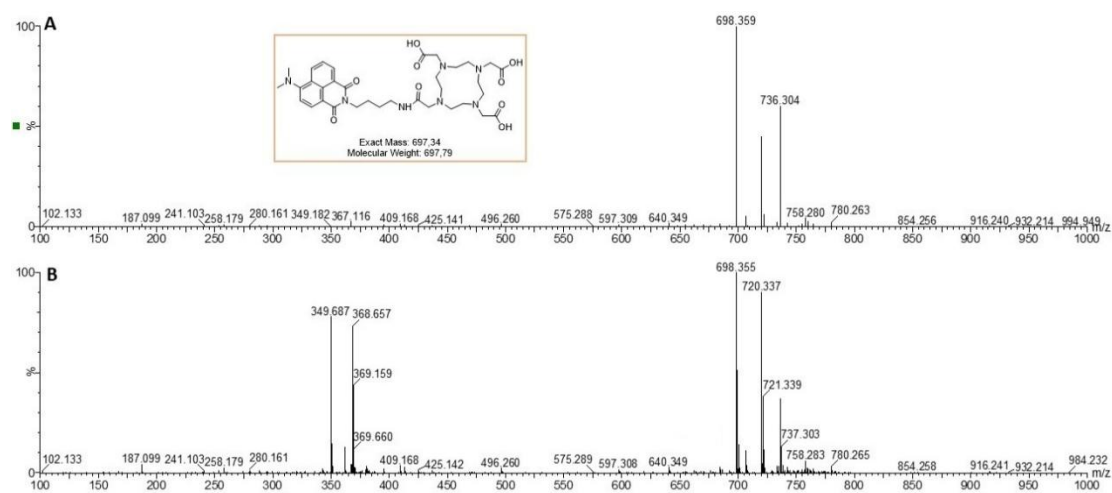


Εικόνα 92: Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 7γ σε DMSO- d_6 με μεγεθύνσεις στις κορυφές των πρωτονίων.

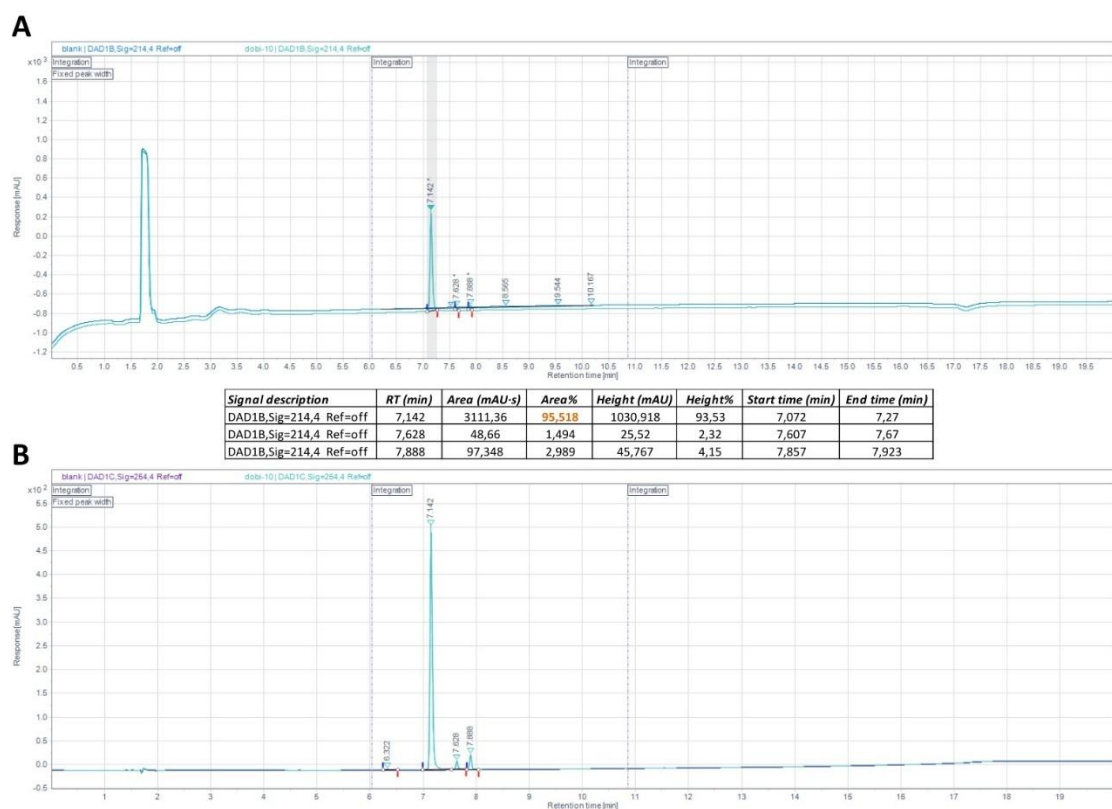
^{13}C δ : 25.0 (C-17), 26.2 (C-18), 38.1 (C-19), 38.9 (C-16), 44.2 (C-49, C-50), 48.8 (C-29, C-30, C-32, C-33), 50.7 (C-23, C-24, C-26, C-27), 53.5 (C-35, C-39, C-43), 54.67 (C-47), 112.77 (C-3), 113.05 (C-1), 122.08 (C-9), 124.0 (C-5), 124.9 (C-7), 129.49 (C-10), 130.46 (C-8), 131.42 (C-6), 132.21 (C-2), 156.39 (C-4), 162.97 (C-11), 163.48 (C-12).



Εικόνα 93: (Α) Υπέρθεση φασμάτων ^1H - ^{13}C HMBC και HSQC της ένωσης 7γ σε $\text{DMSO}-d_6$ με μεγέθυνση (Β) στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων και (C) στην περιοχή των αλειφατικών πρωτονίων.

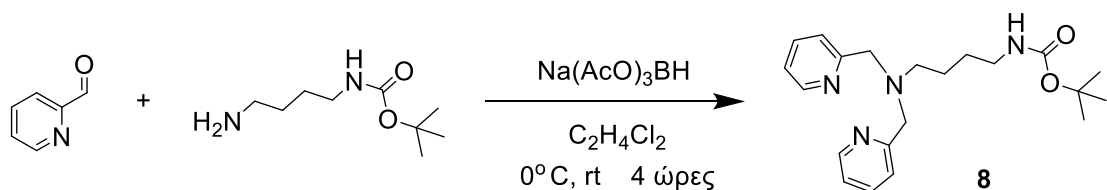


Εικόνα 94: (B) Φάσμα ESI-MS και (A) φάσμα ESI-MS με TOF Transform της ένωσης 7γ με το επιθυμητό m/z : $[M+H]^+=698.369$, καθώς και το $[M+Na]^+=720.337$, $[M+K]^+=736.304$.

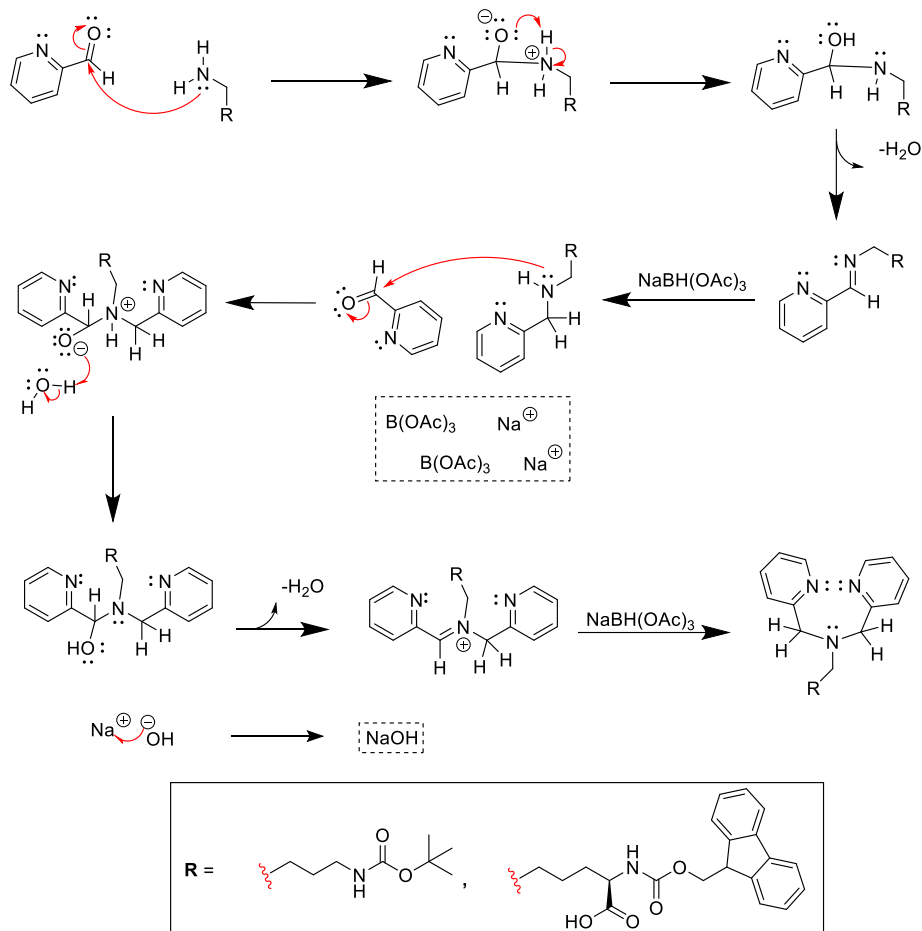


Εικόνα 95: Χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC στα (A) 214nm και (B) 254nm, της ένωσης 7γ με υπέρθεση το χρωματογράφημα του τυφλού. Η ένωση έχει χρόνο κατακράτησης 7.142 min και καθαρότητα 95.518%.

2.11.1 Σύνθεση της Ένωσης 8

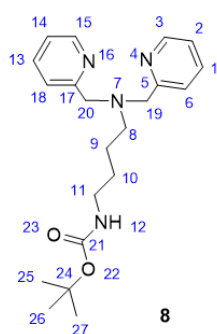


Εικόνα 96: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης 8.



Εικόνα 97: Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού των ενώσεων 8 και 12.

Σε δίλιπμη σφαιρική φιάλη προστέθηκε η 2-πυριδινοκαρβοξυαλδεΐδη (334 μl , 3.51 mmol) και η N-(τριτ-βουτοξυκαρβονυλ)-1,4-βουτανοδιαμίνη (305 μl , 1.59 mmol) με 15 ml 1,2-διχλωροαιθάνιο ($\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$) ως διαλύτη. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε παγόλουτρο για 10 λεπτά υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Στη συνέχεια προστέθηκε το τριακετοξυβοροϋδρίδιο του νατρίου (845 mg, 3.98 mmol) και η αντίδραση αναδεύτηκε για 15 λεπτά στους 0°C και 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια στο μίγμα προστίθενται 10 ml H_2O και η ανάδευση συνεχίζεται για 1.5 ώρα. Το pH του μείγματος ρυθμίζεται στο 10 με την προσθήκη διαλύματος NaOH 2.5M και ακολουθεί εκχύλιση με CH_2Cl_2 (3 x 10ml). Οι οργανικές στιβάδες συλλέγονται, ξηραίνονται με Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό μειωμένη πίεση στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το ακατέργαστο προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με $\text{MeOH} - \text{CH}_2\text{Cl}_2$ ως διαλύτες έκλουσης. Το προϊόν εκλούστηκε στο 3% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ και μετά από εξάτμιση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα, λήφθηκε η ένωση **8** ως σκούρο κίτρινο έλαιο¹¹³.



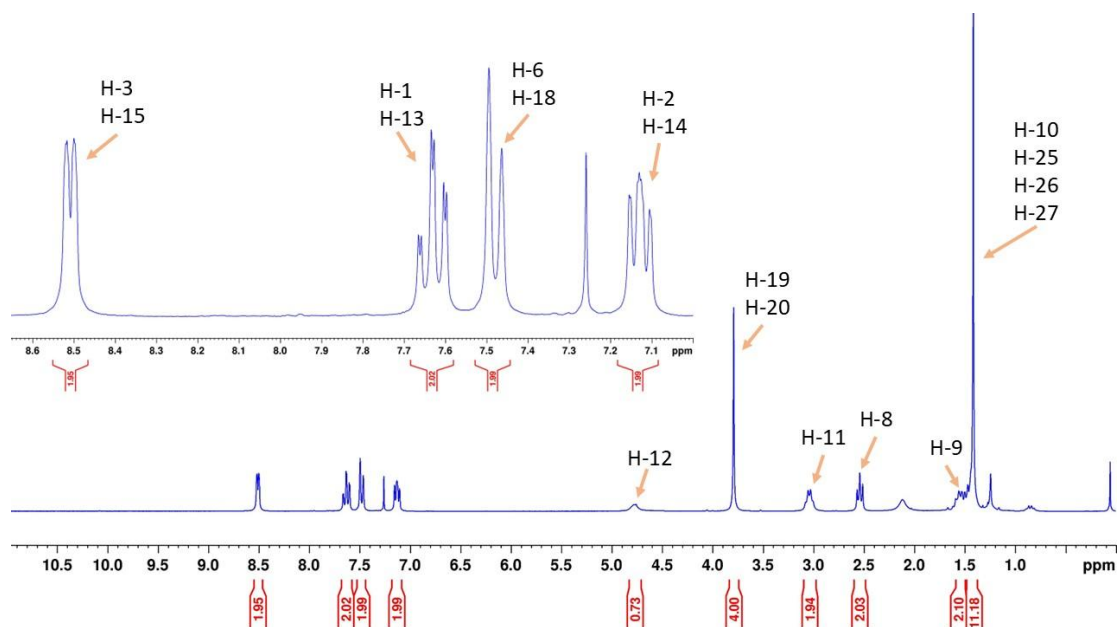
Ένωση **8** : Τερτ-βουτυλ (4-(δισ(πυριδιν-2-υλμεθυλ)αμινο)βουτυλ)-καρβαμικό

Ποσότητα 511.7mg, απόδοση 86.8%

TLC σε 3% v/v MeOH/CH₂Cl₂ και εμφάνιση με διάλυμα νινυδρίνης

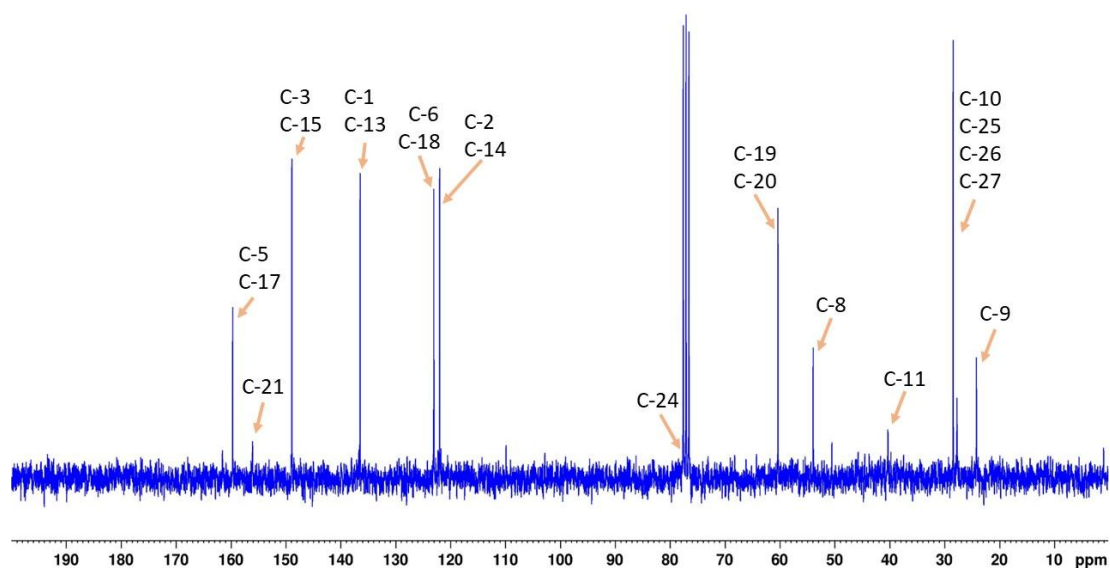
2.11.2 Χαρακτηρισμός της ένωσης 8

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ: 8.51 (ddd, *J* = 4.9, 1.9, 0.9 Hz, 2H), 7.63 (td, *J* = 7.6, 1.8 Hz, 2H), 7.48 (dt, *J* = 7.9, 1.2 Hz, 2H), 7.13 (ddd, *J* = 7.5, 4.9, 1.3 Hz, 2H), 4.78 (s, 1H), 3.79 (s, 4H), 3.04 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.54 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.60 – 1.48 (m, 2H), 1.42 (s, 11H).



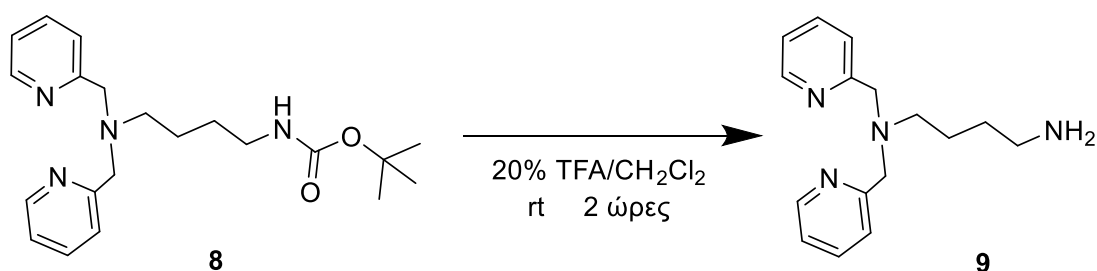
Εικόνα 98: Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης 8 σε CDCl₃ με μεγεθύνσεις στις κορυφές των πρωτονίων.

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃) δ: 159.66, 156.14, 148.90, 136.46, 123.04, 121.98, 60.33, 53.91, 40.50, 28.42, 27.84, 24.17.



Εικόνα 99: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης **8** σε CDCl_3 .

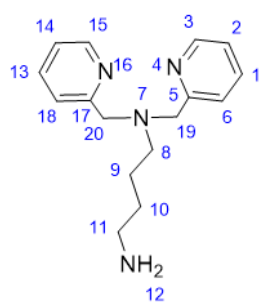
2.12.1 Σύνθεση της Ένωσης 9



Εικόνα 100: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης **9**.

Ο πιθανός μηχανισμός της αντίδρασης είναι όμοιος με τον μηχανισμό της Εικόνας 59.

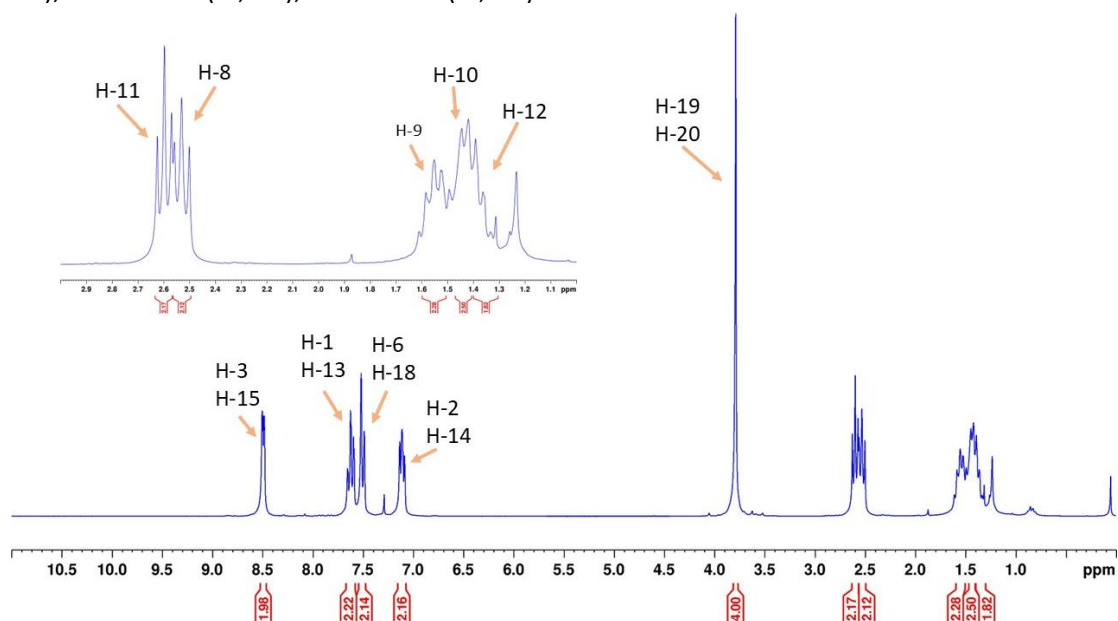
Σε μία σφαιρική προστέθηκε η ένωση **8** (500 mg, 1.35 mmol) με 10ml διαλύματος 20% TFA/ CH_2Cl_2 . Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Στην συνέχεια ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το υπόλειμμα διαλύεται σε CH_2Cl_2 και πλένεται με νερό (2 x 5ml) το οποίο ρυθμίστηκε σε pH 10 με NaOH 2.5M. Η οργανική στοιβάδα ξηραίνεται με Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το πορτοκαλί-κίτρινο λάδι είναι η ένωση **9**¹¹³.



Ένωση **9**: N1,N1-δισ(πυριδιν-2-υλμεθυλ)βουταν-1,4-διαμίνη
 Ποσότητα 308.6mg, απόδοση 84.6%
 TLC σε 3% v/v MeOH/ CH_2Cl_2 και εμφάνιση με διάλυμα νινυδρίνης

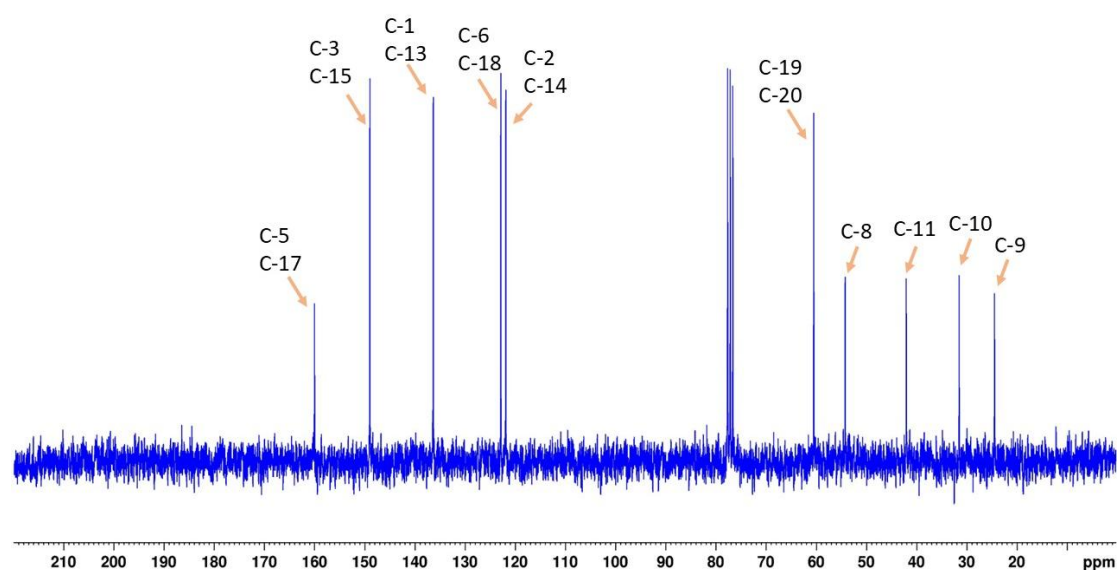
2.12.2 Χαρακτηρισμός της ένωσης 9

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ : 8.54 – 8.44 (m, 2H), 7.62 (td, J = 7.6, 1.8 Hz, 2H), 7.50 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.17 – 7.05 (m, 2H), 3.79 (s, 4H), 2.56 (dt, J = 17.2, 7.1 Hz, 4H), 1.65 – 1.50 (m, 2H), 1.47 – 1.37 (m, 2H), 1.38 – 1.28 (m, 2H).



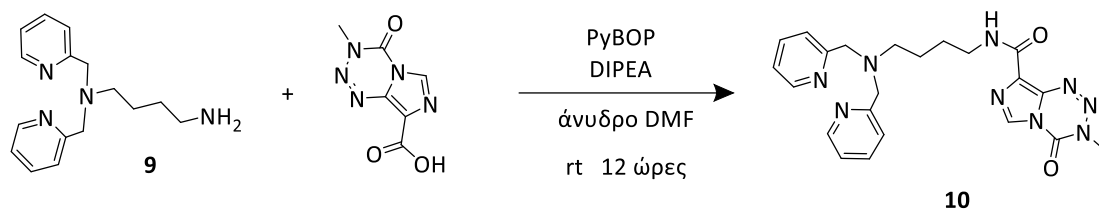
Εικόνα 101: Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 9 σε CDCl_3 με μεγεθύνσεις στις κορυφές των πρωτονίων.

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ : 159.97, 148.94, 136.31, 122.83, 121.85, 60.46, 54.20, 42.02, 31.47, 24.42 .



Εικόνα 102: Φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης 9 σε CDCl_3 .

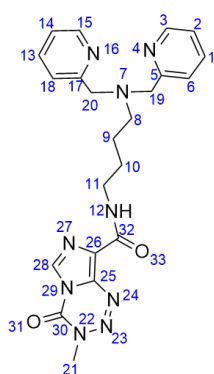
2.13.1 Σύνθεση της Ένωσης 10



Εικόνα 103: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης **10**.

Ο πιθανός μηχανισμός της αντίδρασης είναι όμοιος με τον μηχανισμό της Εικόνας 66.

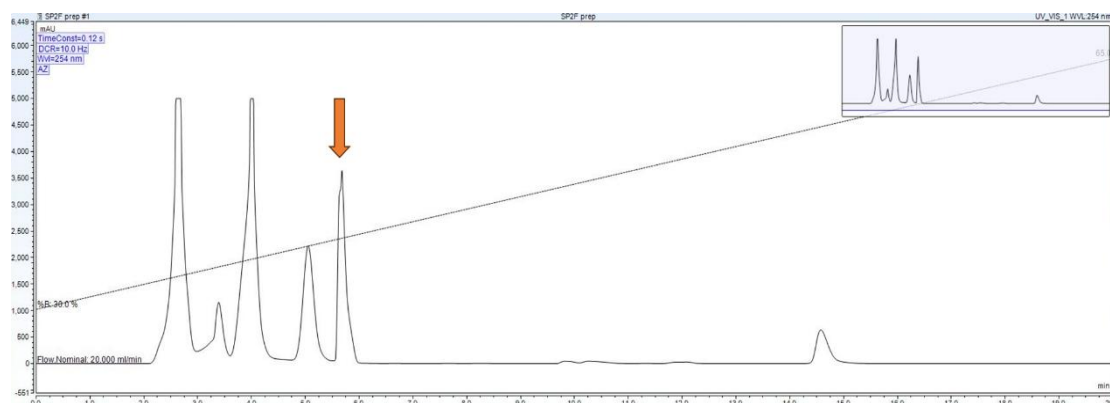
Σε ξηρή σφαιρική φιάλη με 2ml άνυδρο DMF προστίθεται το PyBOP (90.9 mg, 0.174 mmol), η DIPEA (26 μ l, 0.149 mmol) και η 3-Μεθυλ-4-οξο-3,4-διυδροϊμιδαζο[5,1-d][1,2,3,5]τετραζινο-8-καρβοξυλικό οξύ (TMZ-COOH, 28.42 mg, 0.145 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται υπό ατμόσφαιρα αζώτου για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια προστίθεται η ένωση **9** (35.8 mg, 0.132mmol) και η ανάδευση συνεχίζεται για 12 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Μετά την ολοκλήρωσή της, ο διαλύτης απομακρύνεται με απόσταξη υπό υψηλό κενό. Το ακατέργαστο προϊόν καθαρίζεται με HPLC με σύστημα διαλυτών από 70%A:30%B σε 35%A:65%B με ροή 20 mL/min για 20 mins με τον ανιχνευτή στα 254 nm (όπου A: H₂O + 0.1% TFA, B: ACN + 0.1% TFA).



Ένωση **10**: N-(4-(δισ(πυριδιν-2-υλμεθυλ)αμινο)βουτυλ)-3-μεθυλ-4-οξο-3,4-διυδροϊμιδαζο[5,1-d][1,2,3,5]τετραζίνη-8-καρβοξαμίδιο

Ποσότητα 18.4mg, απόδοση 33.3 %

TLC σε 5% v/v MeOH/CH₂Cl₂

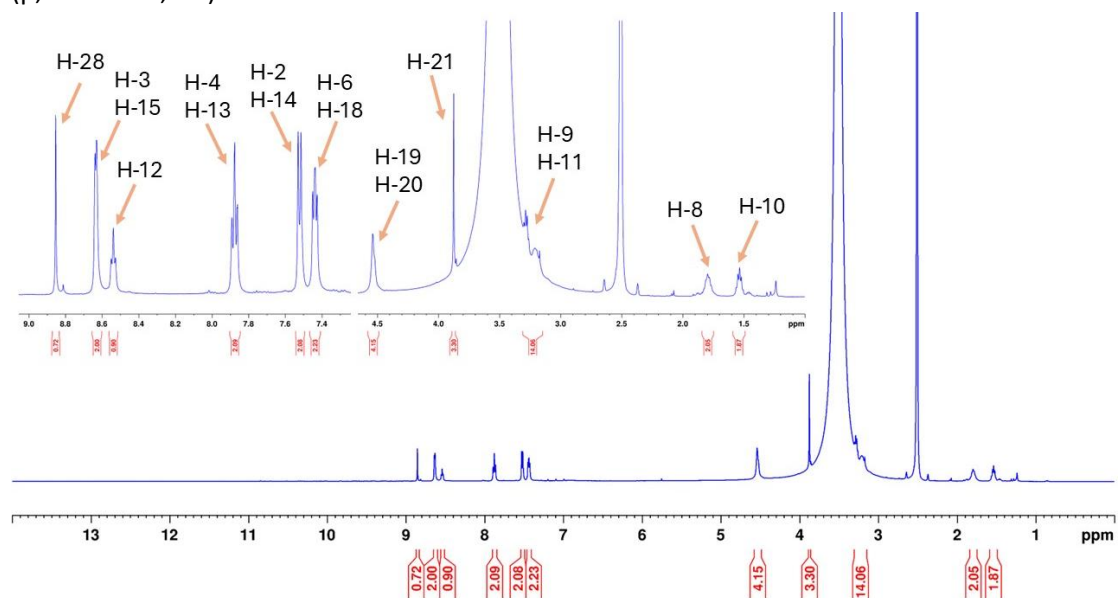


Εικόνα 104: Χρωματογράφημα HPLC της ένωσης **10** με την κορυφή του προϊόντος σε χρόνο $t=5.76$ min.

2.13.2 Χαρακτηρισμός της ένωσης **10**

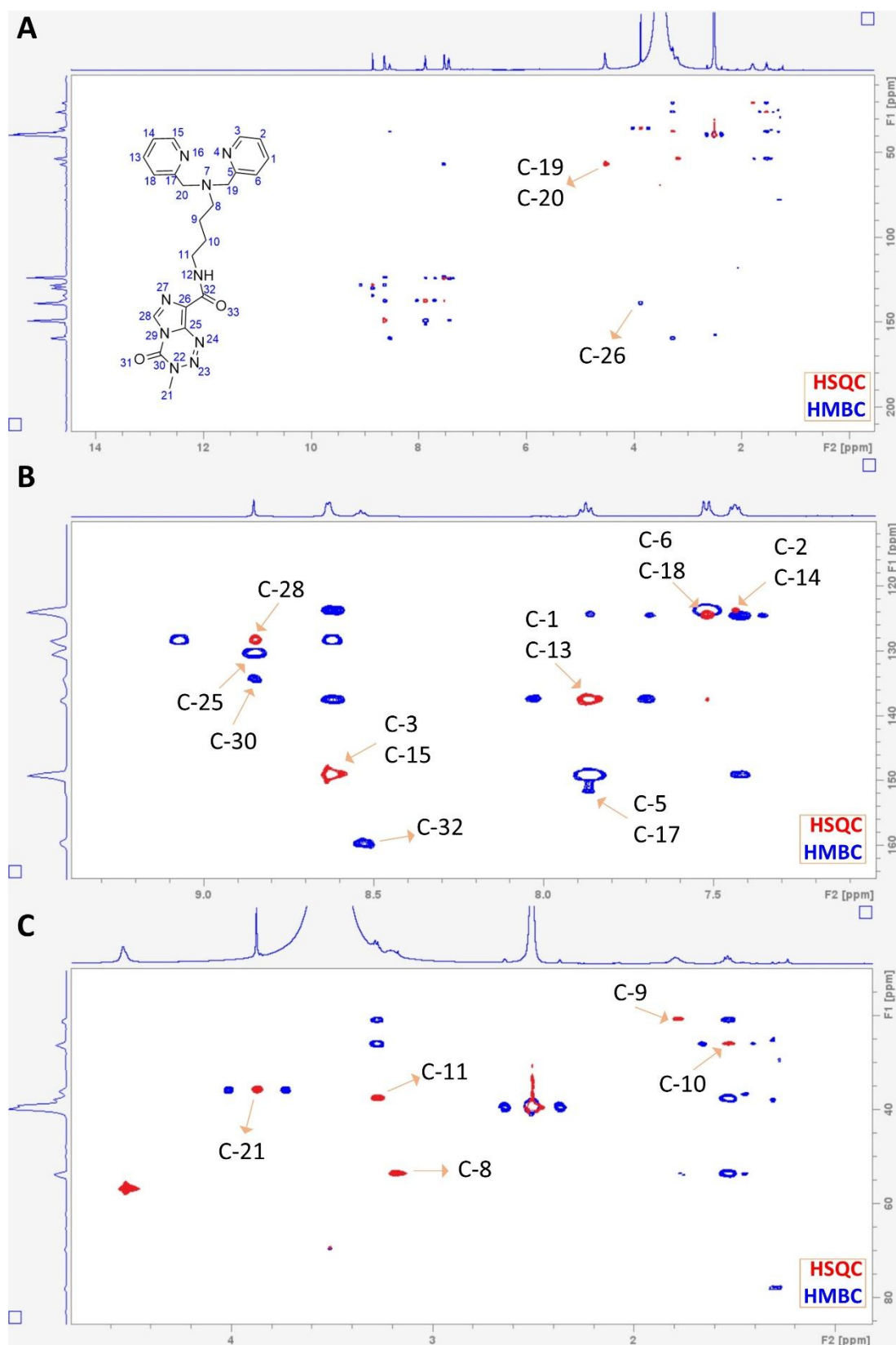
¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ : 8.85 (s, 1H), 8.66 – 8.61 (m, 2H), 8.54 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.88 (td, J = 7.7, 1.8 Hz, 2H), 7.52 (d, J = 7.6, 2H), 7.44 (dd, J = 7.6, 5.0 Hz, 2H), 4.53 (d, J = 9.0

Hz, 4H), 3.88 (s, 3H), 3.28 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.23 – 3.17 (m, 2H), 1.80 (p, $J = 7.9$ Hz, 2H), 1.53 (p, $J = 7.3$ Hz, 2H).

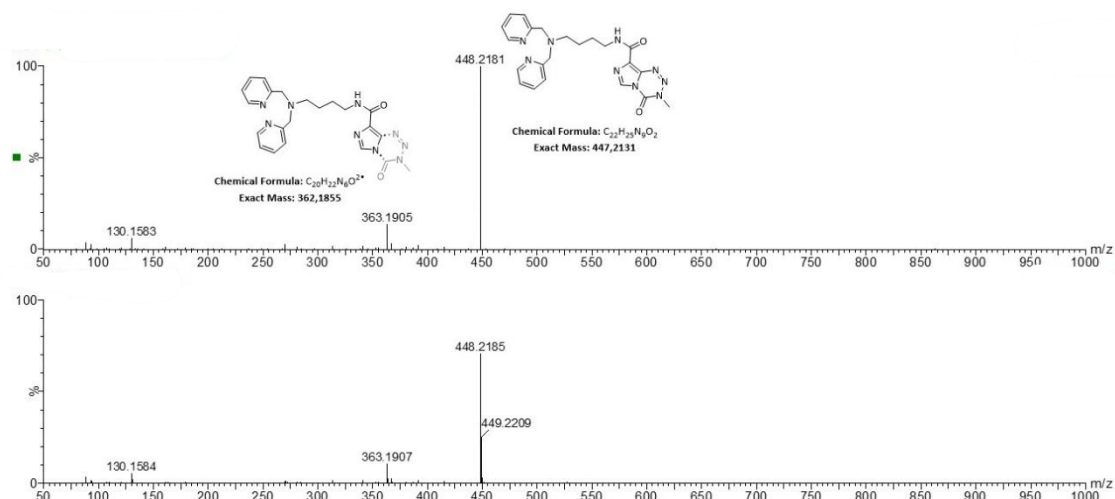


Εικόνα 105: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **10** σε DMSO-d_6 με μεγεθύνσεις στις κορυφές των πρωτονίων.

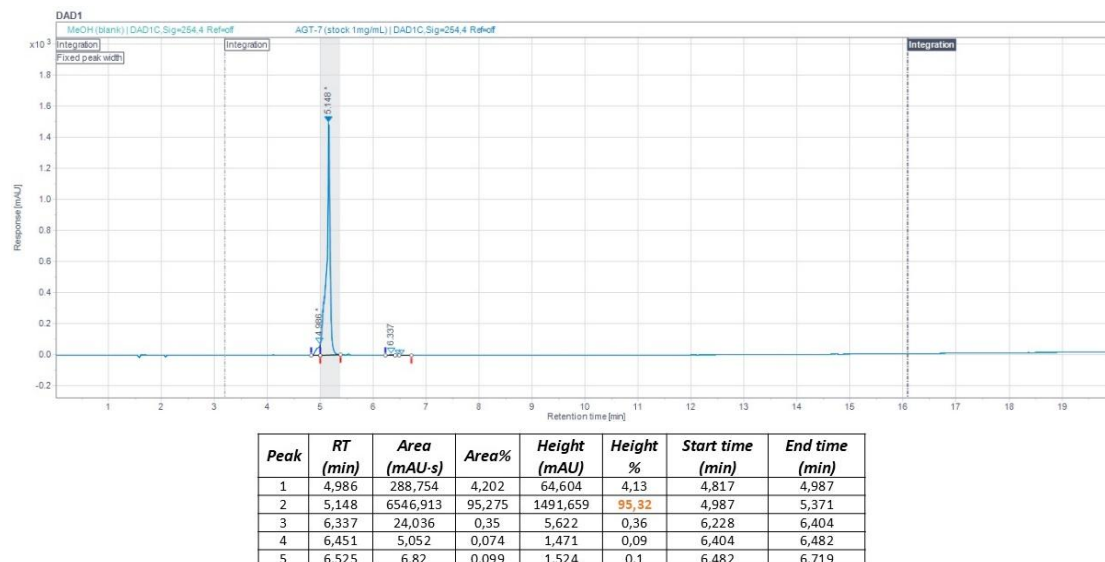
^{13}C δ : 159.60 (C-32), 151.2 (C-5, C-17), 149.14 (C-3, C-15), 139.09 (C-26), 137.45 (C-1, C-13), 134.17 (C-30), 130.27 (C-25), 128.22 (C-28), 124.53 (C-6, C-18), 123.71 (C-2, C-14), 53.57 (C-8), 37.57 (C-12), 35.93 (C-21), 26.08 (C-10), 20.96 (C-9).



Εικόνα 106: (Α) Υπέρθεση φασμάτων ^1H - ^{13}C HMBC και HSQC της ένωσης 10 σε $\text{DMSO}-d_6$ με μεγέθυνση (Β) στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων και (C) στην περιοχή των αλειφατικών πρωτονίων.

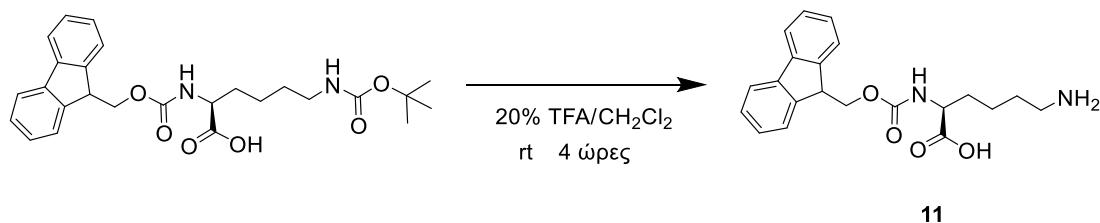


Εικόνα 107: Φάσμα ESI-MS της ένωσης 10 (κάτω) και φάσμα με TOF Transform (πάνω) με το επιθυμητό m/z : $[M+H]^+ = 448.2181$.



Εικόνα 108: Χρωματογράφημα αναλυτικής HPLC της ένωσης 10 με υπέρθεση το χρωματογράφημα του τυφλού η οποία έχει χρόνο κατακράτησης $t=5.15$ mins και η καθαρότητα 95.3%.

2.14.1 Σύνθεση της ένωσης 11

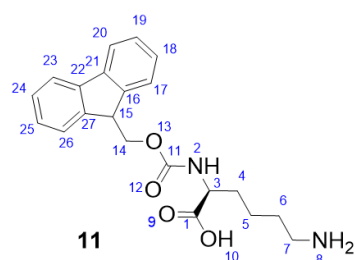


Εικόνα 109: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης 11.

Ο πιθανός μηχανισμός της αντίδρασης είναι όμοιος με τον μηχανισμό της Εικόνας 59.

Σε μία σφαιρική προστέθηκε η Fmoc-Lys-(Boc)-OH (500 mg, 1.0671 mmol) με 12ml διαλύματος 20% TFA/ CH₂Cl₂. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες. Στην συνέχεια ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το

υπόλειμμα διαλύεται σε 10ml διεθυλαιθέρα και πλένεται με νερό (2 x 5ml). Η οργανική στοιβάδα ξηραίνεται με Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα δίνοντας την ένωση **11** ως λευκό στερεό¹¹⁴.



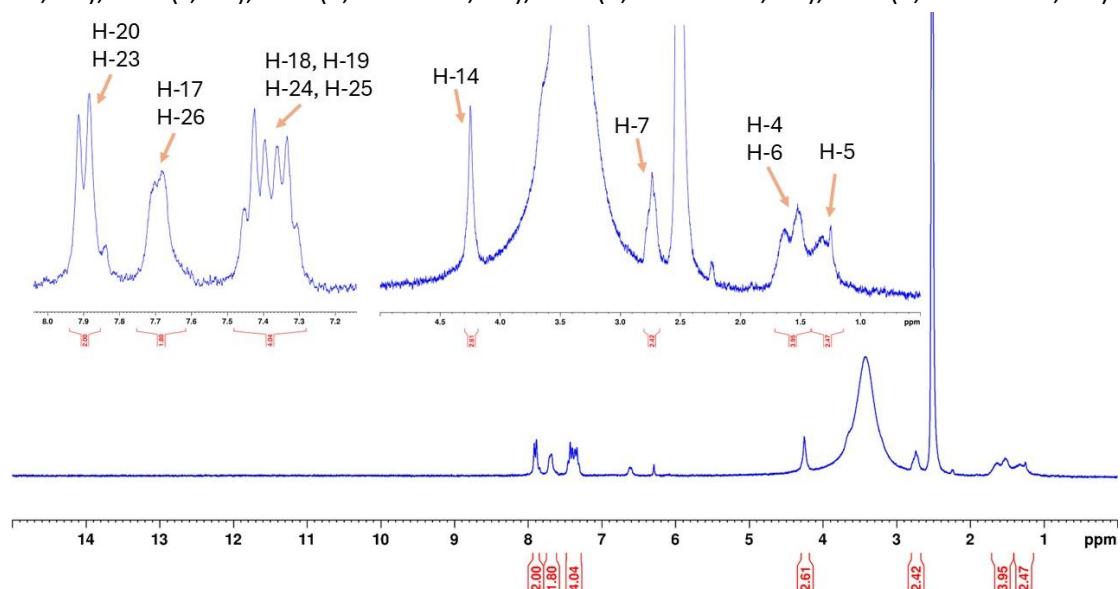
Ένωση **11**: (((9H-φλουορεν-9-υλ)μεθοξυ)καρβονυλ)-L-λυσίνη

Ποσότητα 379.6mg, απόδοση 96.5%

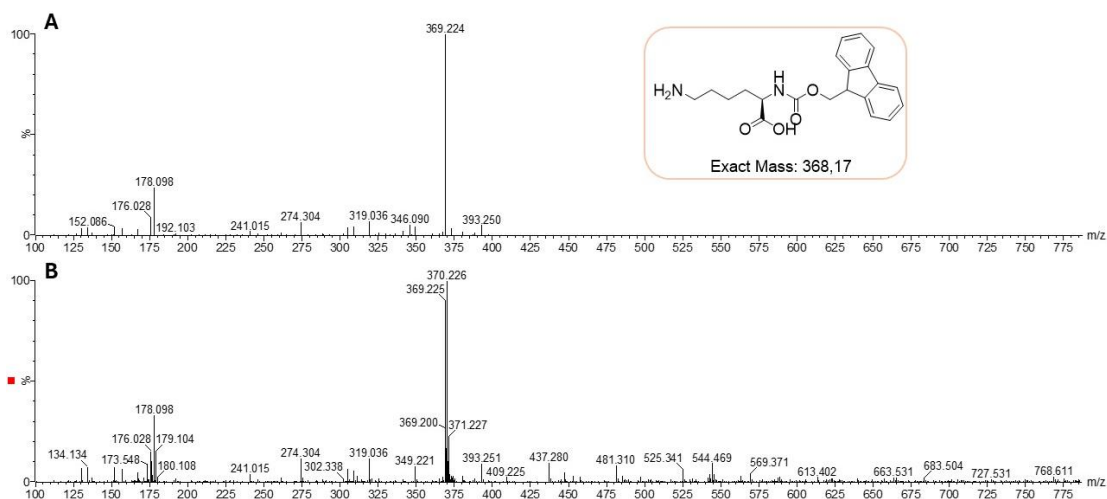
TLC σε 2% v/v MeOH/CH₂Cl₂ και εμφάνιση με διάλυμα νινυδρίνης

2.14.2 Χαρακτηρισμός της ένωσης **11**.

¹H NMR (250 MHz, DMSO) δ: 7.90 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.38 (dt, *J* = 23.0, 7.3 Hz, 2H), 4.25 (s, 1H), 2.72 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 1.58 (d, *J* = 31.3 Hz, 2H), 1.29 (d, *J* = 20.1 Hz, 2H).

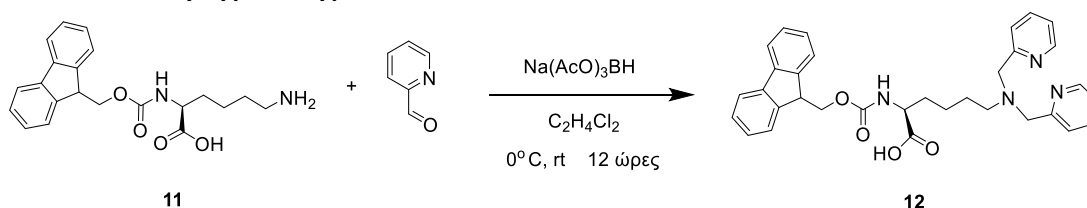


Εικόνα 110: Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης **11** σε DMSO-d₆ με μεγεθύνσεις στις κορυφές των πρωτονίων.



Εικόνα 11: Φάσμα ESI-MS της ένωσης 11 (B) και φάσμα με TOF Transform (A) με το επιθυμητό m/z: $[M+H]^+ = 369.224$.

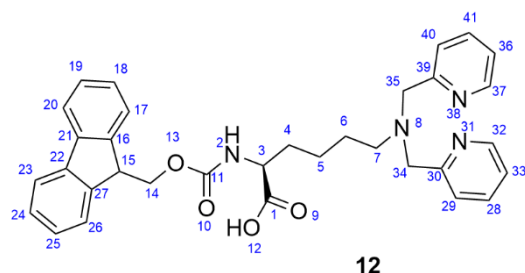
2.15.1 Σύνθεση της ένωσης 12



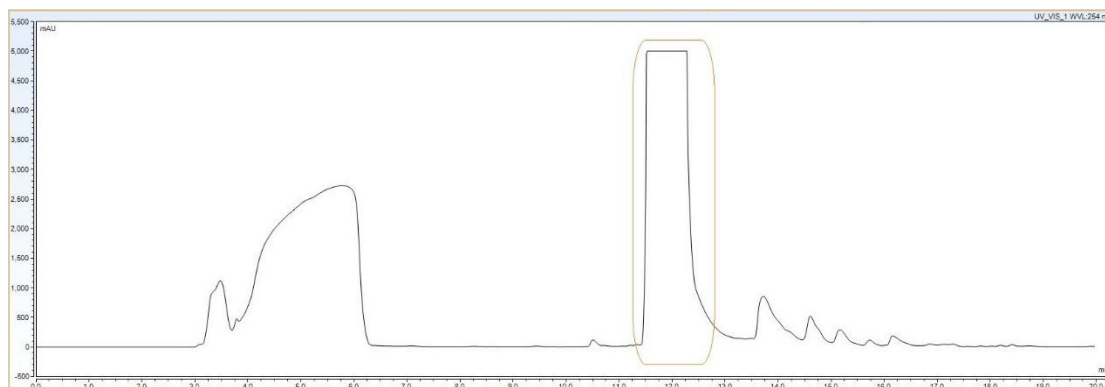
Εικόνα 112: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης 12.

Ο πιθανός μηχανισμός της αντίδρασης είναι όμοιος με τον μηχανισμό της Εικόνας 97.

Σε δύλιμη σφαιρική φιάλη προστέθηκε η ένωση **11** (200 mg, 0.5428 mmol) και η 2-πυριδινοκαρβοξυαλδεΐδη (108.5 μl, 1.1399 mmol) με 7 ml 1,2-διχλωροαιθάνιο ($C_2H_4Cl_2$) ως διαλύτη. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε παγόλουτρο για 10 λεπτά υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Στη συνέχεια προστέθηκε το τριακετοξυβοροϋδρίδιο του νατρίου (287.6 mg, 1.3571 mmol) και η αντίδραση αναδεύτηκε για 15 λεπτά στους 0°C και 12 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια στο μίγμα προστίθενται 10 ml H_2O και η ανάδευση συνεχίζεται για 1.5 ώρα. Ακολουθεί εκχύλιση με CH_2Cl_2 (3 x 10ml). Οι οργανικές στιβάδες συλλέγονται, ξηραίνονται με Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό μειωμένη πίεση στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το ακατέργαστο προϊόν καθарίστηκε με HPLC με σύστημα διαλυτών από 90%A:10%B σε 15%A:85%B με ροή 20 mL/min για 20 mins με τον ανιχνευτή στα 254 nm (όπου A: H_2O + 0.1% TFA, B: ACN + 0.1% TFA) ¹¹³. Η κορυφή σε χρόνο t=11.5-12.5 min είναι η ένωση **12**.



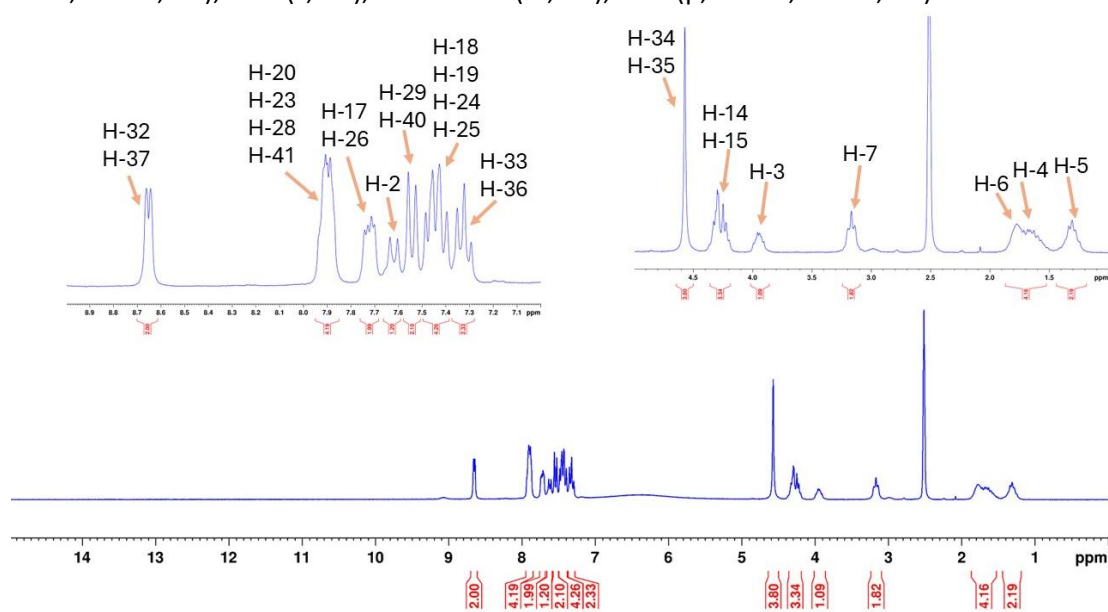
Ένωση **12**: N2-(((9H-φλουορεν-9-υλ)μεθοξυ)καρβονυλ)-N6,N6-δισ(πυριδιν-2-υλμεθυλ)-L-λυσίνη
Ποσότητα 232.8mg, απόδοση 77.8%
TLC σε 2% v/v MeOH/ CH_2Cl_2



Εικόνα 113: Χρωματογράφημα HPLC της ένωσης 12 με την κορυφή του προϊόντος σε χρόνο $t=11.5-12.5$ mins.

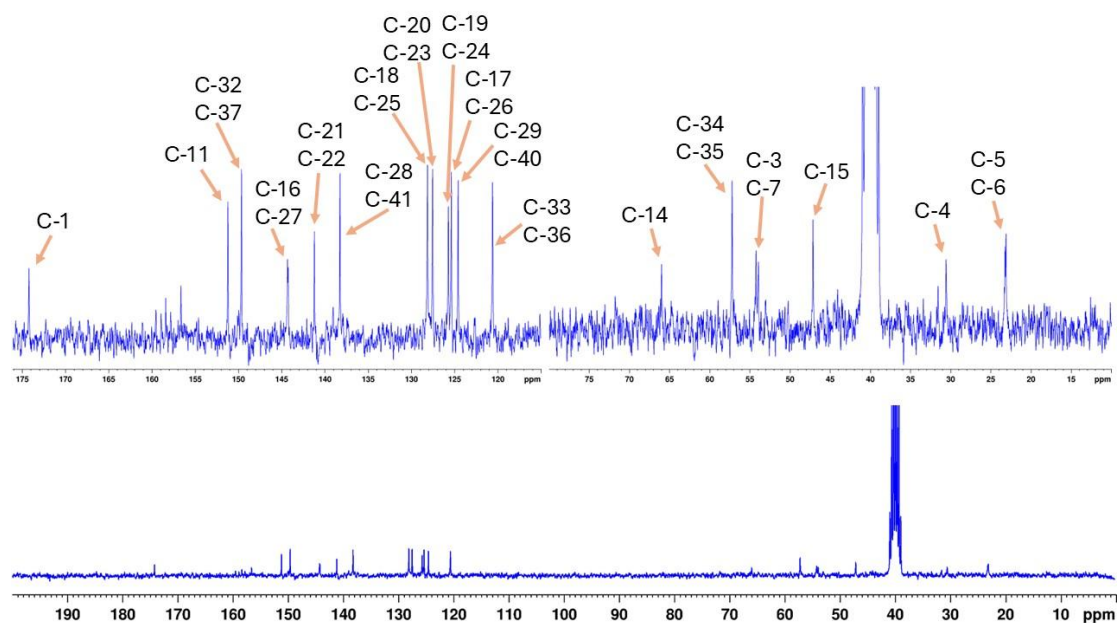
2.15.2 Χαρακτηρισμός της ένωσης 12

^1H NMR (250 MHz, DMSO) δ : 8.70 – 8.61 (m, 2H), 7.90 (qd, $J = 4.8, 1.8$ Hz, 4H), 7.72 (dd, $J = 7.5, 3.6$ Hz, 2H), 7.62 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.50 – 7.38 (m, 4H), 7.32 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 4.57 (s, 4H), 4.37 – 4.19 (m, 3H), 3.95 (td, $J = 8.9, 4.9$ Hz, 1H), 3.17 (h, $J = 8.0, 7.0$ Hz, 2H), 1.77 (s, 2H), 1.69 – 1.50 (m, 2H), 1.31 (p, $J = 8.7, 8.3$ Hz, 2H).

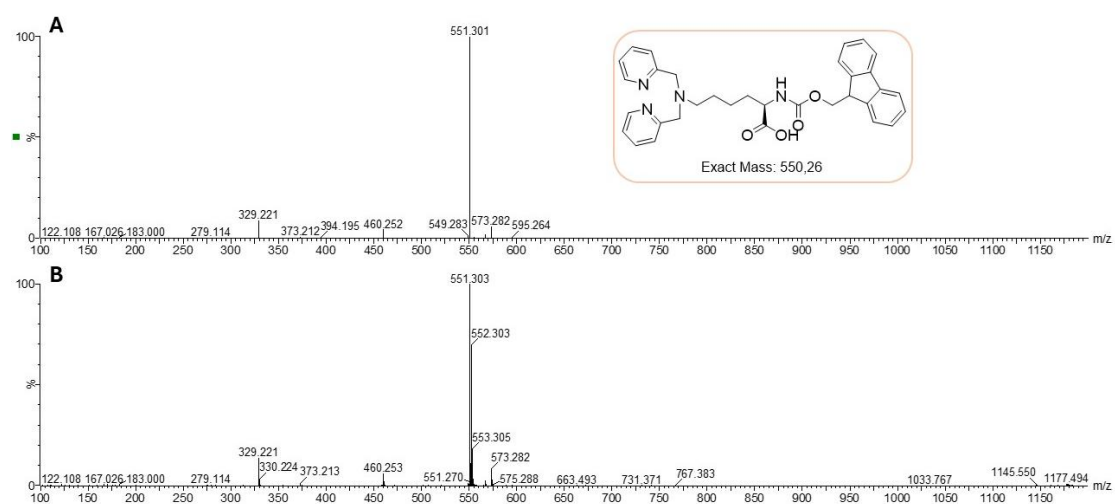


Εικόνα 114: Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 12 σε DMSO- d_6 με μεγεθύνσεις στις κορυφές των πρωτονίων.

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO) δ : 174.22, 151.20, 149.64, 144.31, 144.22, 141.20, 138.24, 128.12, 127.53, 125.70, 125.36, 124.57, 120.59, 66.00, 57.22, 54.22, 53.93, 47.14, 30.57, 23.22, 23.11.

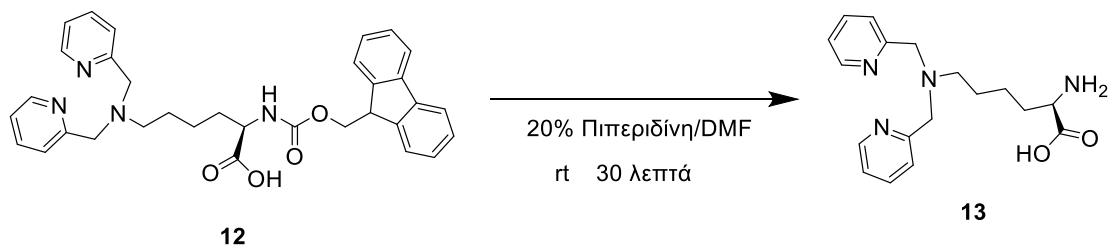


Εικόνα 115: Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 12 σε $\text{DMSO}-d_6$ με μεγεθύνσεις στις κορυφές των ανθράκων.

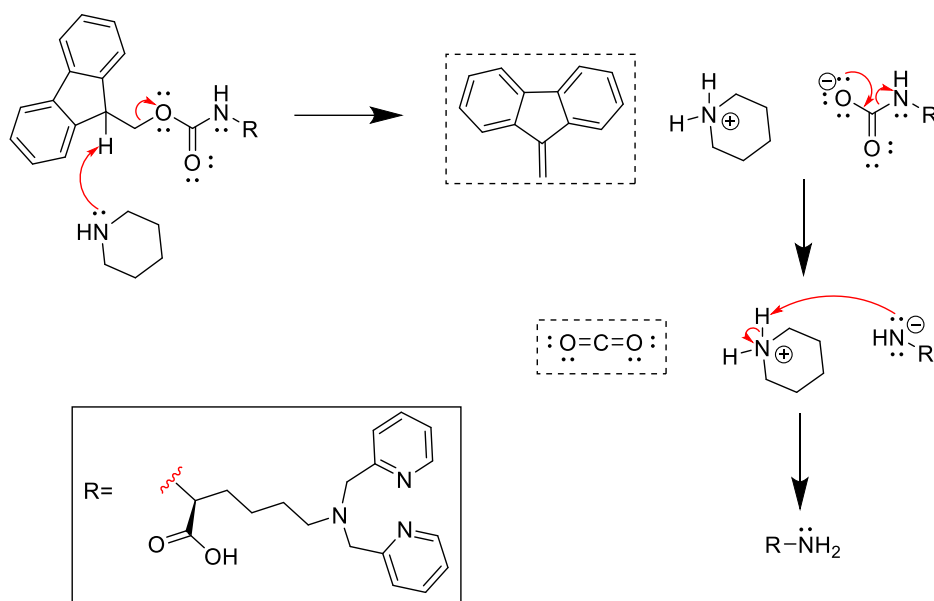


Εικόνα 116: Φάσμα ESI-MS της ένωσης 12 (B) και φάσμα με TOF Transform (A) με το επιθυμητό m/z : $[M+H]^+ = 551.301$.

2.16.1 Σύνθεση της ένωσης 13

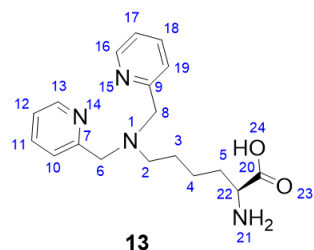


Εικόνα 118: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης 13.



Εικόνα 117: Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού της ένωσης 13.

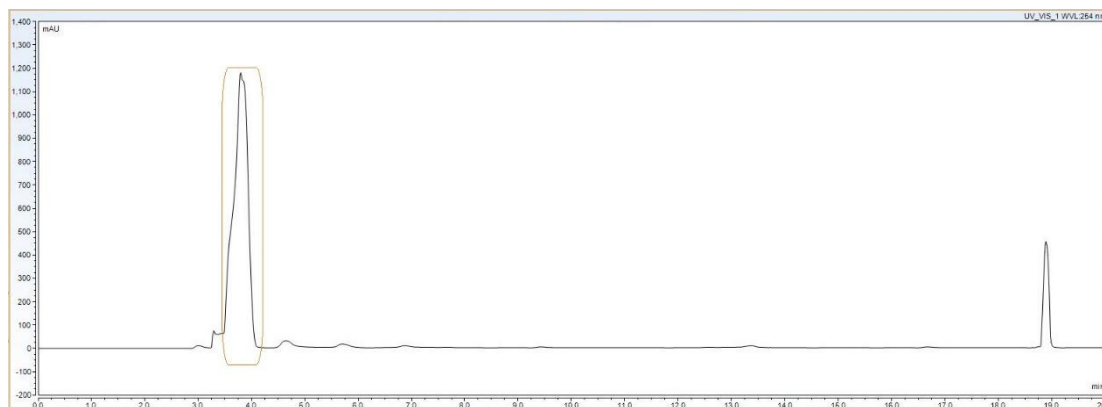
Σε σφαιρική προστέθηκε η ένωση **12** (50 mg, 0.0908 mmol) με 22ml διαλύματος 20% πιπεριδίνη/DMF. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Στην συνέχεια ο διαλύτης απομακρύνεται με απόσταξη υπό υψηλό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με HPLC με σύστημα διαλυτών από 90%A:10%B σε 50%A:50%B με ροή 20 mL/min για 20 mins με τον ανιχνευτή στα 254 nm (όπου A: H₂O + 0.1% TFA, B: ACN + 0.1% TFA) δίνοντας την ένωση **13**.



Ένωση **13**: N6,N6-δισ(πυριδιν-2-υλμεθυλ)-L-λυσίνη

Ποσότητα 27.6mg, απόδοση 92.6%

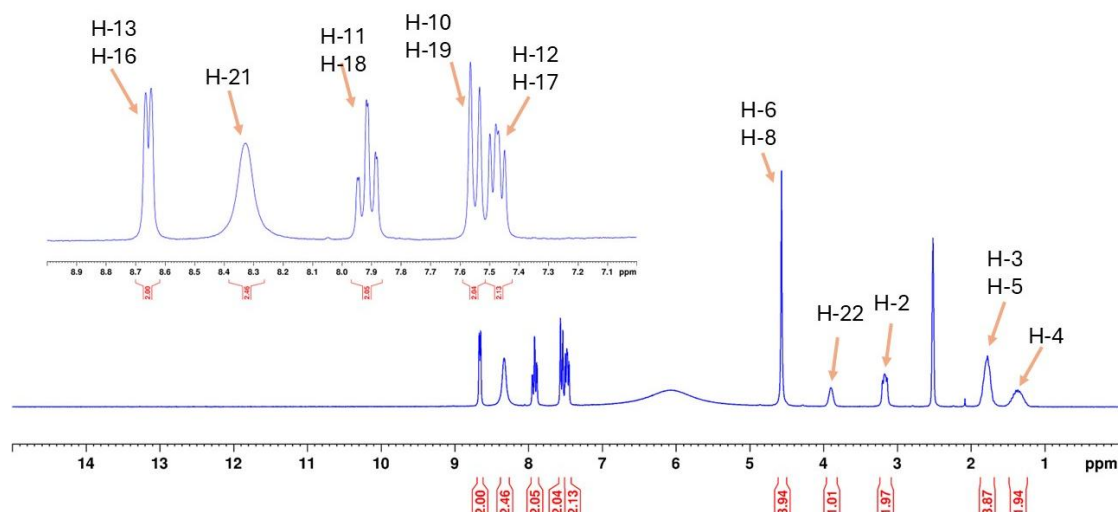
TLC σε 2% v/v MeOH/CH₂Cl₂



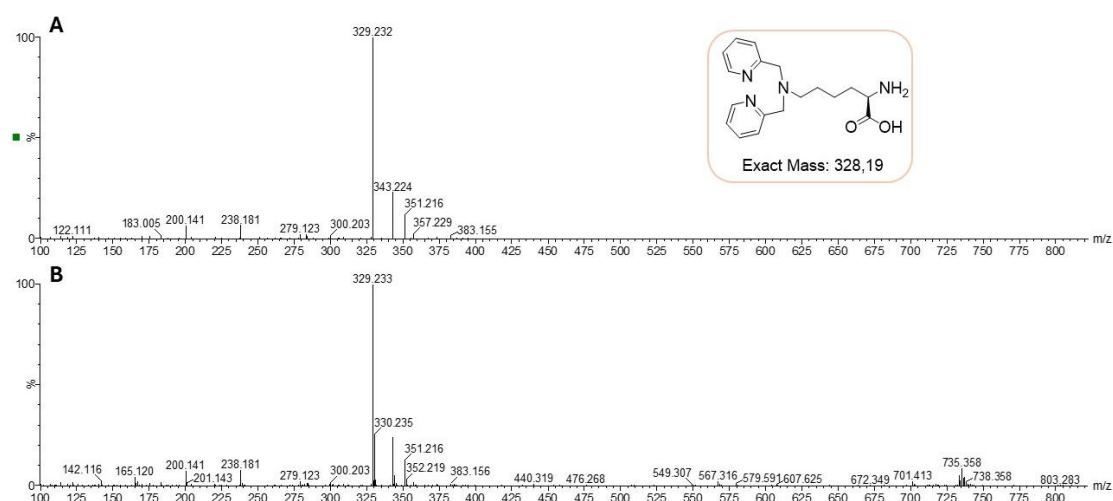
Εικόνα 119: Χρωματογράφημα HPLC της ένωσης 13 με την κορυφή του προϊόντος σε χρόνο t=3.80 min.

2.16.2 Χαρακτηρισμός της ένωσης 13

^1H NMR (250 MHz, DMSO) δ : 8.66 (dd, J = 5.0, 1.7 Hz, 2H), 8.33 (s, 2H), 7.91 (td, J = 7.7, 1.8 Hz, 2H), 7.55 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.47 (dd, J = 7.6, 5.0 Hz, 2H), 4.57 (s, 4H), 3.89 (s, 1H), 3.23 – 3.10 (m, 2H), 1.77 (h, J = 6.8, 6.2 Hz, 4H), 1.39 (t, J = 14.5 Hz, 2H).

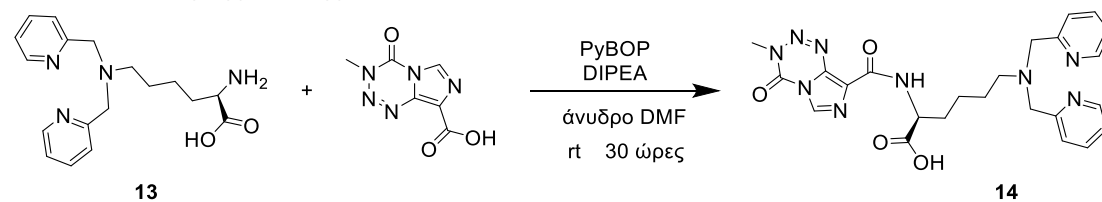


Εικόνα 120: Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 13 σε DMSO- d_6 με μεγεθύνσεις στις κορυφές των πρωτονίων.



Εικόνα 121: Φάσμα ESI-MS της ένωσης 13 (B) και φάσμα με TOF Transform (A) με το επιθυμητό m/z : $[M+H]^+ = 329.232$.

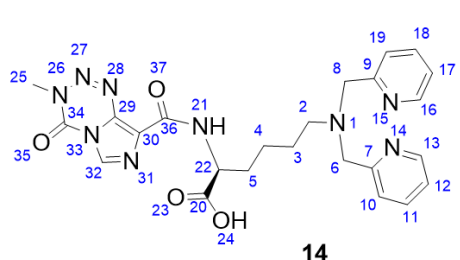
2.16.1 Σύνθεση της ένωσης 14



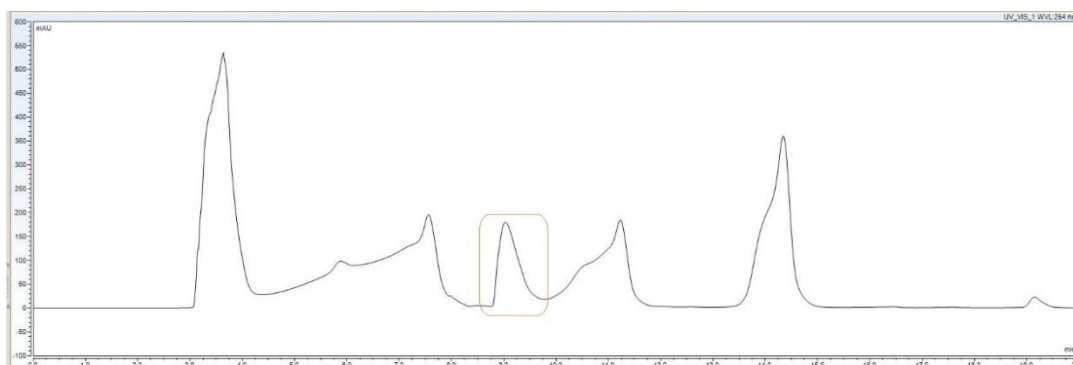
Εικόνα 122: Αντίδραση σχηματισμού της Ένωσης 14.

Ο πιθανός μηχανισμός της αντίδρασης είναι όμοιος με τον μηχανισμό της Εικόνας 66.

Σε ξηρή σφαιρική φιάλη με 1.5ml άνυδρο DMF προστίθεται το PyBOP (35.8 mg, 0.0688 mmol), η DIPEA (8.21 μ l, 0.0635 mmol) και η TMZ-COOH (11.37 mg, 0.0582 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται υπό ατμόσφαιρα αζώτου για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια προστίθεται η ένωση **13** (17.4 mg, 0.0529mmol) και η ανάδευση συνεχίζεται για 30 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Μετά την ολοκλήρωσή της, ο διαλύτης απομακρύνεται με απόσταξη υπό υψηλό κενό. Το ακατέργαστο προϊόν καθαρίζεται με HPLC με σύστημα διαλυτών από 90%A:10%B σε 50%A:50%B με ροή 20 mL/min για 20 mins με τον ανιχνευτή στα 254 nm (όπου A: H₂O + 0.1% TFA, B: ACN + 0.1% TFA). Η ένωση **14** έχει χρόνο κατακράτησης $t=9.10$ min.

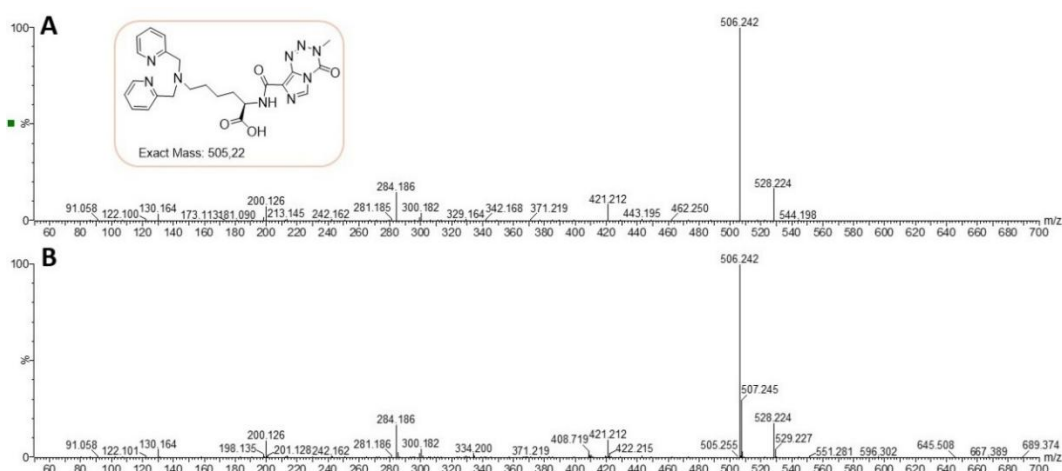


Ένωση **14**: N2-(3-μεθυλ-4-οξο-3,4-διυδροϊμιδαζο [5,1-d][1,2,3,5]τετραζινο-8-καρβονυλ)-N6,N6-δισ (πυριδιν-2-υλμεθυλ)-L-λυσίνη
Ποσότητα 5.6mg, απόδοση 24.9 %
TLC σε 5% v/v MeOH/CH₂Cl₂



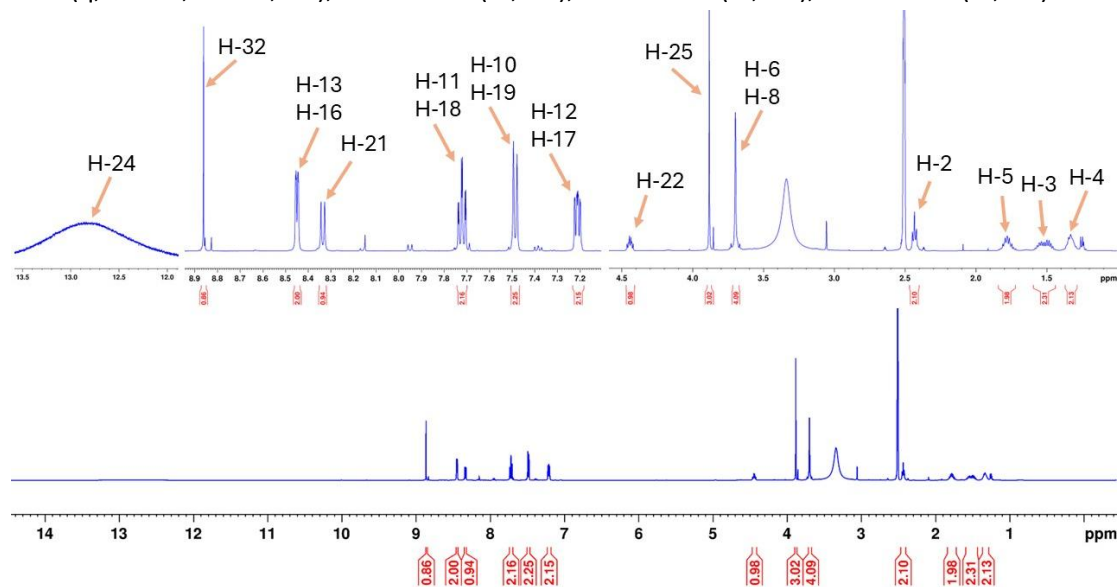
Εικόνα 123: Χρωματογράφημα HPLC της ένωσης **14** με την κορυφή του προϊόντος σε χρόνο $t=9.10$ min.

2.16.2 Χαρακτηρισμός της ένωσης **14**



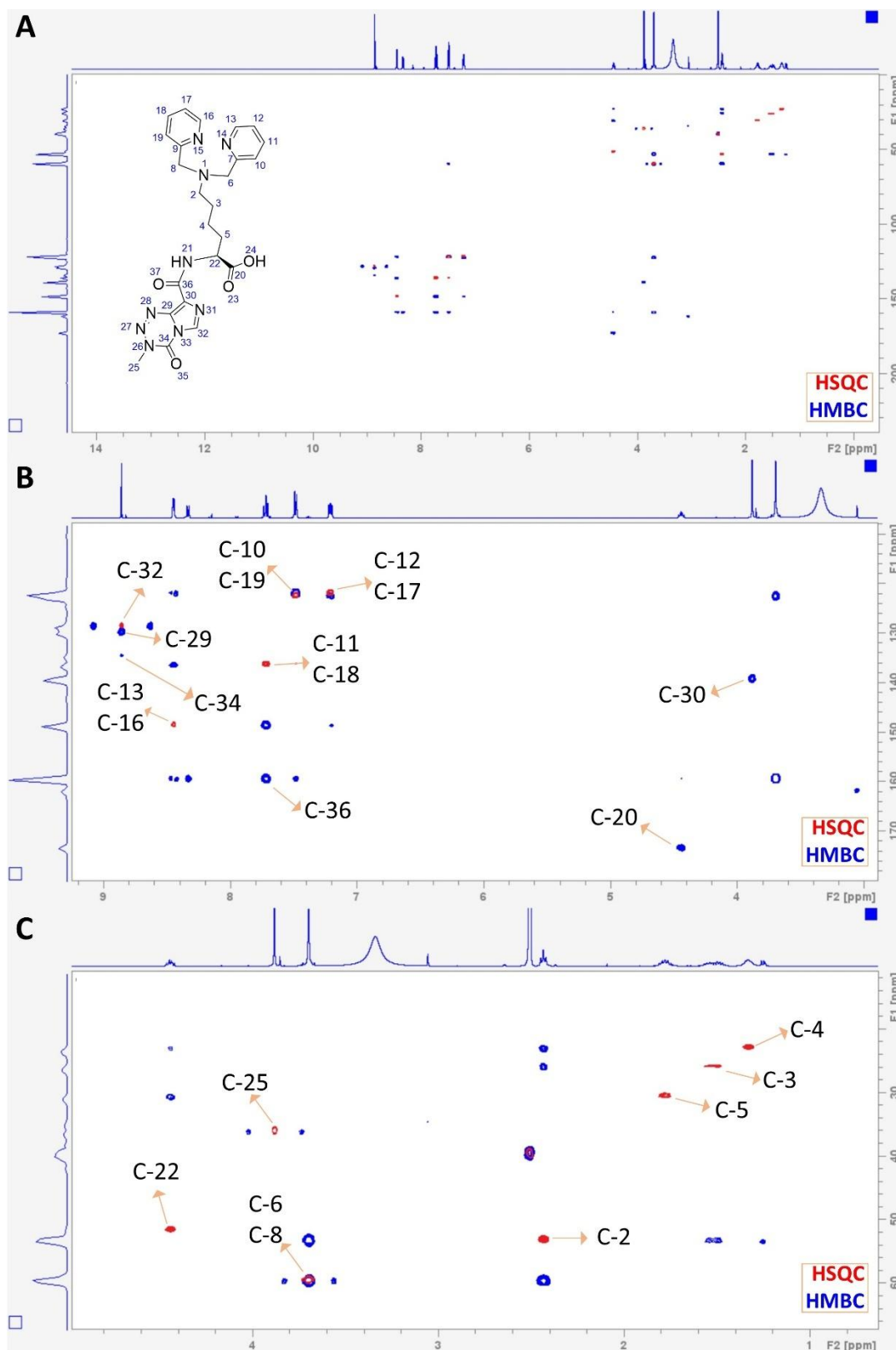
Εικόνα 124: Φάσμα ESI-MS της ένωσης **14** (B) και φάσμα με TOF Transform (A) με το επιθυμητό m/z : $[M+H]^+ = 506.242$ και $[M+Na]^+ = 528.224$.

^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ : 12.79 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.45 (ddd, J = 4.8, 1.9, 0.9 Hz, 2H), 8.34 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.72 (td, J = 7.7, 1.8 Hz, 2H), 7.49 (dt, J = 7.9, 1.1 Hz, 2H), 7.21 (ddd, J = 7.5, 4.8, 1.2 Hz, 2H), 4.44 (td, J = 8.1, 5.1 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.70 (d, J = 1.6 Hz, 4H), 2.43 (q, J = 6.5, 6.0 Hz, 2H), 1.82 – 1.72 (m, 2H), 1.59 – 1.44 (m, 2H), 1.35 – 1.29 (m, 2H).



Εικόνα 125: Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης **14** σε $\text{DMSO}-d_6$ με μεγεθύνσεις στις κορυφές των πρωτονίων.

^{13}C δ : 173.25 (C-20), 159.34 (C-36), 148.52 (C-7, C-9), 148.41 (C-13, C-16), 139.12 (C-30), 136.15 (C-11, C-18), 134.48 (C-34), 129.50 (C-29), 128.24 (C-32), 122.15 (C-10, C-19), 121.69 (C-12, C-17), 59.35 (C-6, C-8), 52.98 (C-2), 51.48 (C-22), 35.98 (C-25), 30.37 (C-5), 25.77 (C-3), 22.63 (C-4).

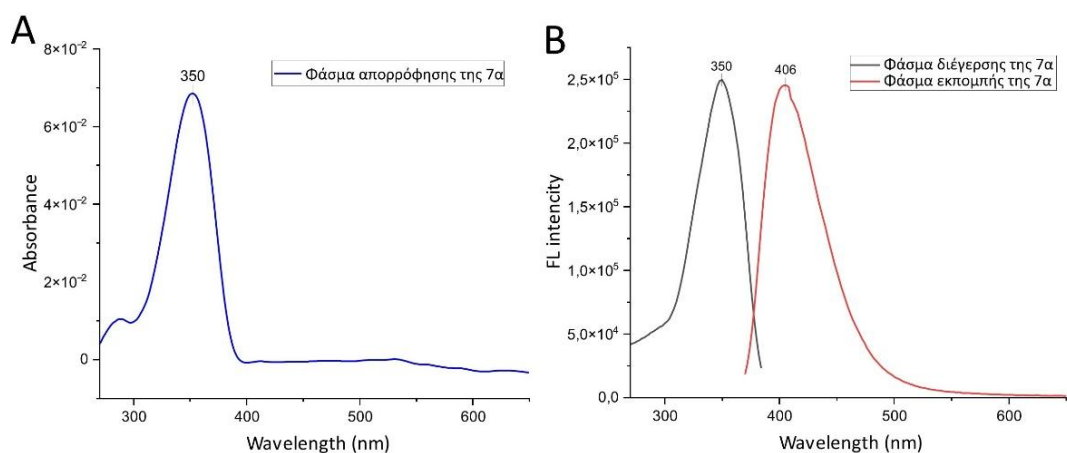


Εικόνα 126: (Α) Υπέρθεση φασμάτων ^1H - ^{13}C HMBC και HSQC της ένωσης 14 σε DMSO-d_6 με μεγέθυνση (Β) στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων και (C) στην περιοχή των αλειφατικών πρωτονίων.

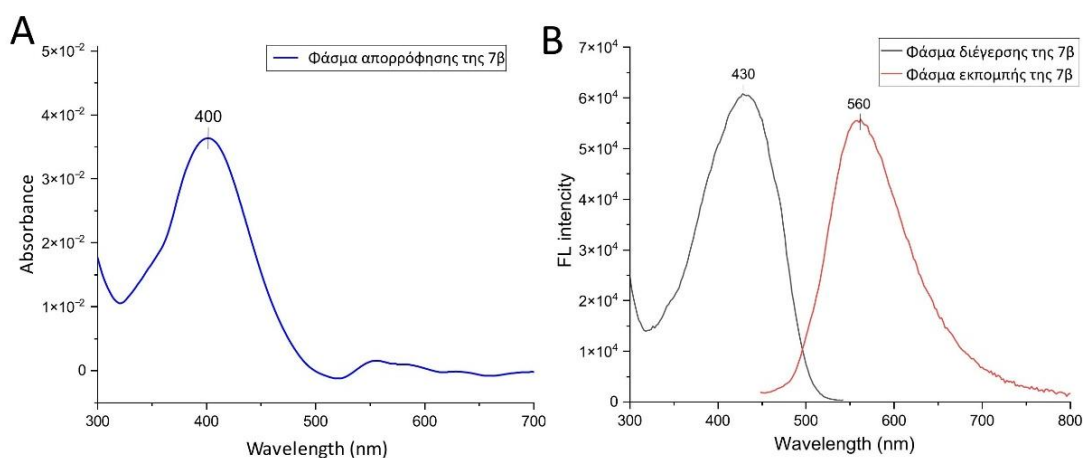
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μελέτη φασματοσκοπικών ιδιοτήτων

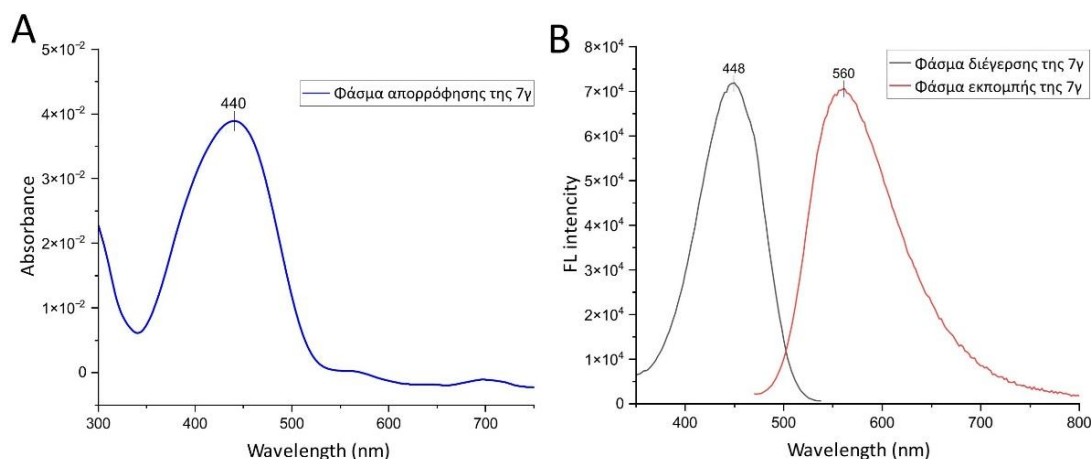
Για την αξιολόγηση των φασματοσκοπικών ιδιοτήτων των ενώσεων **7α**, **7β** και **7γ**, αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα με φασματοσκοπία UV/Vis και φασματοσκοπία φθορισμού αρχικά σε 0.1M Acetate Buffer pH=4.7 (ο όγκος διαλύτη στην κυψελίδα είναι 3ml και η συγκέντρωση 10μM). Η μέγιστη τιμή της απορρόφησης για τις ενώσεις **7α**, **7β**, **7γ** παρατηρήθηκε στα 350nm, 400nm, 440nm αντίστοιχα. Για τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής, η ένωση **7α** έχει $\lambda_{exc}=350\text{nm}$, $\lambda_{em}=406\text{nm}$, Stoke shift = 56nm (Εικόνα 17B), η ένωση **7β** έχει $\lambda_{exc}=430\text{nm}$, $\lambda_{em}=560\text{nm}$, Stoke shift = 130nm (Εικόνα 128B) και η ένωση **7γ** έχει $\lambda_{exc}=448\text{nm}$, $\lambda_{em}=560\text{nm}$, Stoke shift = 112nm (Εικόνα 129B). Βλέπουμε στις ενώσεις **7β** και **7γ** μια μετατόπιση Stokes άνω των 100nm και σε συνδυασμό με την ύπαρξη ενός δότη και ενός δέκτη που συνδέονται μέσω μιας π-γέφυρας ηλεκτρονίων, θα μπορούσαμε να βγει το συμπέρασμα ότι οι ενώσεις φθορίζουν μέσω του ICT φαινομένου.



Εικόνα 127: (A) Φάσμα απορρόφησης και (B) Φάσμα διέγερσης και φθορισμού της ένωσης **7α** (10 μM) σε 0.1M Acetate Buffer pH=4.7 σε θερμοκρασία 25 °C, Step: 2, EmBW: 5, ExcBW: 5.



Εικόνα 128: (A) Φάσμα απορρόφησης και (B) Φάσμα διέγερσης και φθορισμού της ένωσης **7β** (10 μM) σε 0.1M Acetate Buffer pH=4.7 σε θερμοκρασία 25 °C, Step: 2, EmBW: 5, ExcBW: 5.



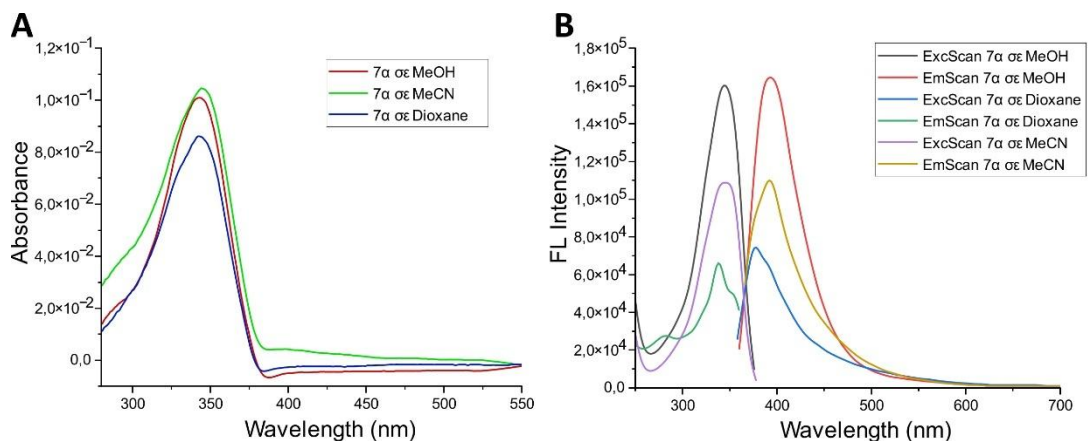
Εικόνα 129: (Α) Φάσμα απορρόφησης και (Β) Φάσμα διέγερσης και φθορισμού της ένωσης 7γ (10 μΜ) σε 0.1M Acetate Buffer pH=4.7 σε θερμοκρασία 25 °C, Step: 2, EmBW: 5, ExcBW: 5.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις και σε τρεις ακόμα διαλύτες οι οποίοι διαφέρουν στην πολικότητα και την ικανότητα τους να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου. Ως μη πολικός διαλύτης επιλέχθηκε το 1.4-διοξάνιο (1.4-Dioxane), ως πολικός απρωτικός διαλύτης το ακετονιτρίλιο (MeCN ή ACN), και ως πολικός πρωτικός διαλύτης η μεθανόλη (MeOH). Στον Πίνακα 11 αναγράφονται τα μέγιστα μήκη κύματος απορρόφησης, διέγερσης και εκπομπής των 3 ενώσεων, και ακολουθούν και τα αντίστοιχα διαγράμματα.

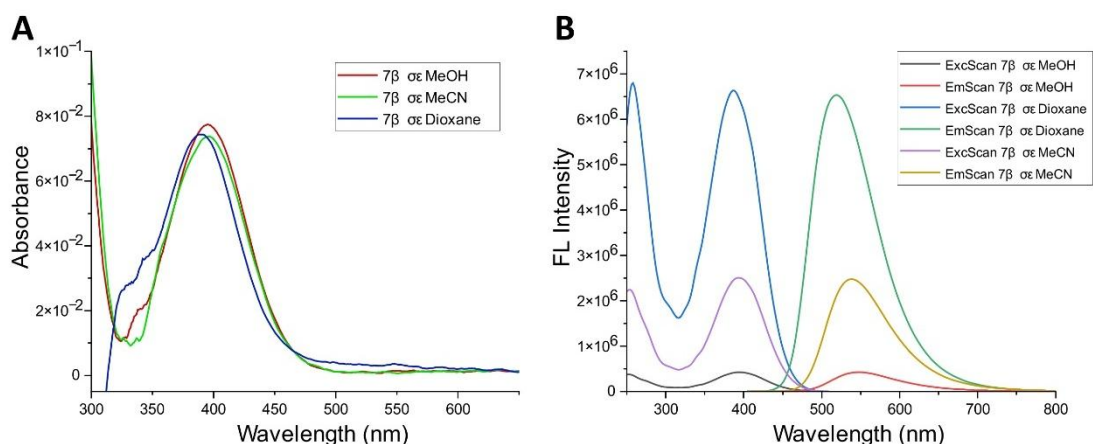
Στην ένωση **7α** δεν υπάρχει μεγάλη μεταβολή στην ένταση του φθορισμού. Αντίθετα, στις **7β** και **7γ**, από το 1.4-διοξάνιο στην MeOH παρατηρείται αρκετά χαμηλότερη ένταση και μετατόπιση του μεγίστου φθορισμού προς μεγαλύτερο μήκος κύματος. Αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί στο ότι οι ενώσεις είναι της μορφής δότης-δέκτης και η διπολική ροπή της διεγερμένης κατάστασης, που δημιουργείται με την μεταφορά φορτίου από τον δότη στον δέκτη λόγω της απορρόφησης φωτός, σταθεροποιείται από τα δίπολα του πολικού διαλύτη.

Πίνακας 11. Μέγιστα μήκη κύματος απορρόφησης, διέγερσης, εκπομπής των ενώσεων στους διάφορους διαλύτες.

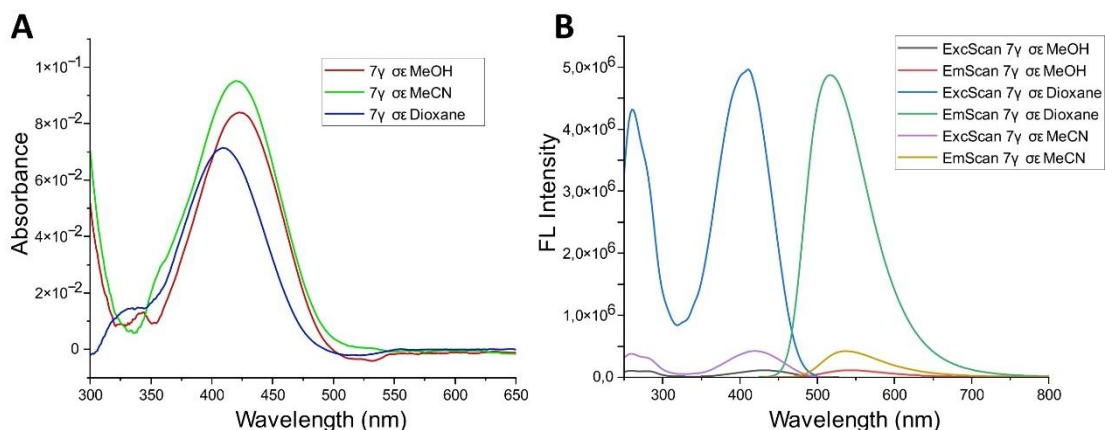
	MeOH	MeCN	1.4-Dioxane
Ένωση			
7α	$\lambda_{\max} = 343 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{exc}} = 344 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 392 \text{ nm}$ Stoke shift = 48 nm	$\lambda_{\max} = 344 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{exc}} = 344 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 392 \text{ nm}$ Stoke shift = 48 nm	$\lambda_{\max} = 343 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 378 \text{ nm}$ Stoke shift = 38 nm
7β	$\lambda_{\max} = 395 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{exc}} = 394 \text{ nm (+ 256 nm)}$ $\lambda_{\text{em}} = 548 \text{ nm}$ Stoke shift = 154 nm	$\lambda_{\max} = 396 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{exc}} = 394 \text{ nm (+ 256 nm)}$ $\lambda_{\text{em}} = 538 \text{ nm}$ Stoke shift = 144 nm	$\lambda_{\max} = 390 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{exc}} = 386 \text{ nm (+ 258 nm)}$ $\lambda_{\text{em}} = 518 \text{ nm}$ Stoke shift = 123 nm
7γ	$\lambda_{\max} = 423 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{exc}} = 430 \text{ nm (+ 262 nm)}$ $\lambda_{\text{em}} = 544 \text{ nm}$ Stoke shift = 114 nm	$\lambda_{\max} = 420 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{exc}} = 418 \text{ nm (+ 262 nm)}$ $\lambda_{\text{em}} = 536 \text{ nm}$ Stoke shift = 116	$\lambda_{\max} = 409 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm (+ 262 nm)}$ $\lambda_{\text{em}} = 516 \text{ nm}$ Stoke shift = 106 nm



Εικόνα 130: (Α) Φάσμα απορρόφησης και (Β) Φάσμα διέγερσης και φθορισμού της ένωσης 7α (10 μM) σε MeOH, MeCN, 1,4-Dioxane σε θερμοκρασία 25 $^{\circ}\text{C}$, Step: 2, EmBW: 5, ExcBW: 5.



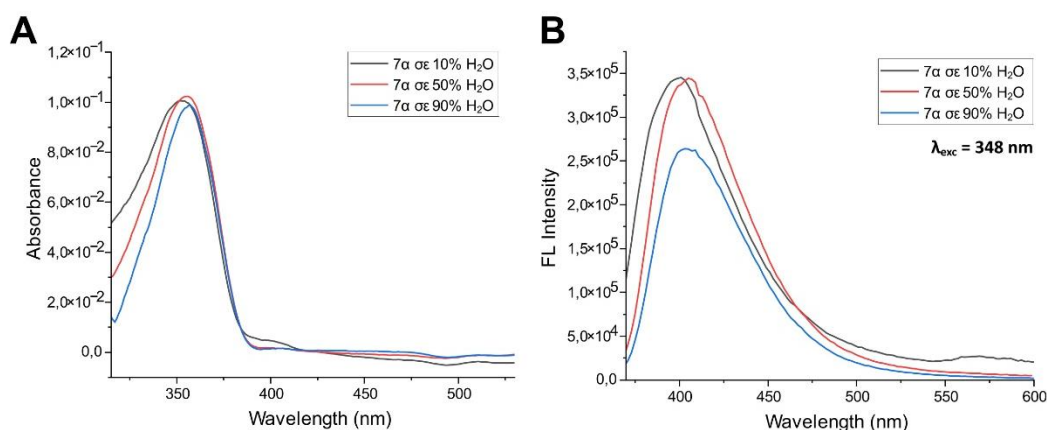
Εικόνα 131: (Α) Φάσμα απορρόφησης και (Β) Φάσμα διέγερσης και φθορισμού της ένωσης 7β (10 μM) σε MeOH, MeCN, 1,4-Dioxane σε θερμοκρασία 25 $^{\circ}\text{C}$, Step: 2, EmBW: 5, ExcBW: 5.



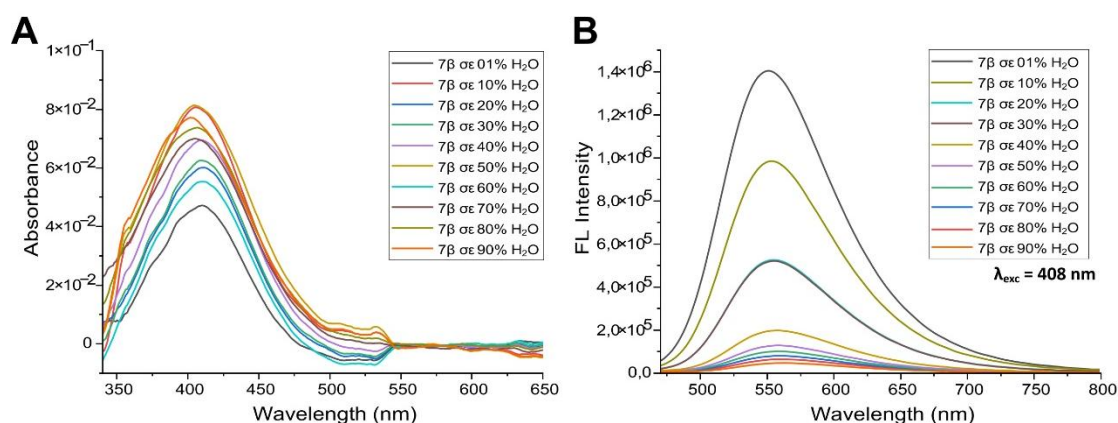
Εικόνα 132: (Α) Φάσμα απορρόφησης και (Β) Φάσμα διέγερσης και φθορισμού της ένωσης 7γ (10 μM) σε MeOH, MeCN, 1,4-Dioxane σε θερμοκρασία 25 $^{\circ}\text{C}$, Step: 2, EmBW: 5, ExcBW: 5.

Λόγω της υπόθεσης πως η ένταση του φθορισμού αλλάζει ανάλογα με το περιβάλλον του μορίου αλλά και λόγω των υποκαταστατών στην 4 θέση του 1,8-ναφθαλιμιδίου, πραγματοποιηθήκαν πειράματα για την μελέτη της ανταπόκριση των ενώσεων **7α**, **7β**, **7γ** στη μεταβολή του ιξώδους μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού, χρησιμοποιώντας διαφορετικά

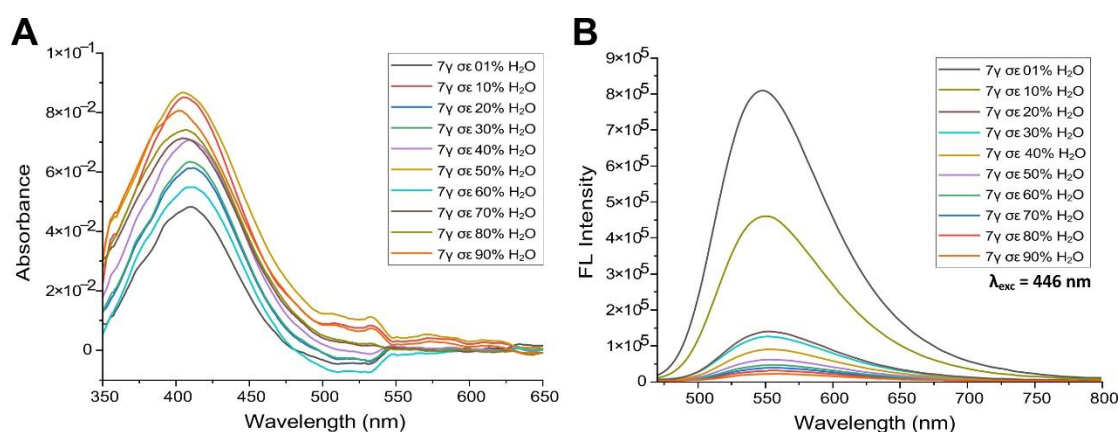
δυσιαδικά μίγματα γλυκερόλης/νερού (από 10% έως 99% γλυκερόλη) σε θερμοκρασία 25°C. Το φυσιολογικό ιξώδες του πλάσματος του αίματος είναι μεταξύ 4 - 6 cP ενώ στο καρκινικό μικροπεριβάλλον συνήθως ξεπερνά τα 40 cP ^{115,116} στους 37 °C. Το δυσιαδικό σύστημα γλυκερόλης/νερού επιλέχθηκε καθώς μπορούν να προσομοιωθούν οι τιμές αυτές (στην εικόνα 164 στο παράρτημα φαίνεται η συσχέτιση των ποσοστών γλυκερόλης με τιμές centipoise του ιξώδους σε διάφορες θερμοκρασίες) ^{115,116}. Αναλυτικότερα, η ένωση **7a** αναμενόμενα δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή στην ένταση του φθορισμού από το 90% στο 10% γλυκερόλη (Εικόνα 133). Η ένταση φθορισμού της ένωσης **7b** στο 99% γλυκερόλη είναι 32.5 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με το 10% γλυκερόλη στα 551 nm και 28.5 φορές μεγαλύτερη στα 563 nm (Εικόνα 134). Όσο αυξάνεται το ποσοστό γλυκερόλης παρατηρείται μετατόπιση του μήκους κύματος προς χαμηλότερα νανόμετρα. Ομοίως, η ένταση φθορισμού της ένωσης **7γ** στο 99% γλυκερόλη είναι 37.9 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με το 10% γλυκερόλη στα 547 nm και 34.7 φορές μεγαλύτερη στα 559 nm (Εικόνα 135). Επίσης παρατηρείται μετατόπιση του μήκους κύματος προς χαμηλότερα νανόμετρα όσο αυξάνεται το ποσοστό γλυκερόλης. Συνεπώς πράγματι, οι ενώσεις **7b** και **7γ** ανταποκρίνονται στις μεταβολές του ιξώδους λόγω μείωσης της περιστροφής του δότη. Ταυτόχρονα για τις ενώσεις **7b** και **7γ** όπου παρατηρείται αλλαγή του μέγιστου μήκους κύματος τόσο απορρόφησης όσο και διέγερσης σε υψηλό και χαμηλό ποσοστό νερού μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι αναφερθείσες ενώσεις φθορίζουν μέσω του φαινομένου TICIT. Πιο συγκεκριμένα ο φθορισμός τους επηρεάζεται από το μέσο στο οποίο βρίσκονται και από την δυνατότητα τους να περιστρέφονται ελεύθερα. Από την άλλη η ένωση **7a** δεν εμφανίζει αντίστοιχο φαινόμενο οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι ο φθορισμός της δεν επηρεάζεται από την δυνατότητα περιστροφής της ένωσης και ο φθορισμός της οφείλεται αποκλειστικά στην ύπαρξη ενός δέκτη και ενός δότη και την ροή της ηλεκτρονικής πυκνότητας από τον δέκτη και μέσω της π-γέφυρας στον δότη (ICT).



Εικόνα 133: (Α) Φάσματα απορρόφησης και (Β) φάσματα φθορισμού της ένωσης της ένωσης 7a (10 μΜ) σε διαφορετικά δυσιαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού (από 0% έως 99% γλυκερόλη) με διέγερση στα 348 nm σε θερμοκρασία 25 °C, Step: 2, EmBW: 5, ExcBW: 5.

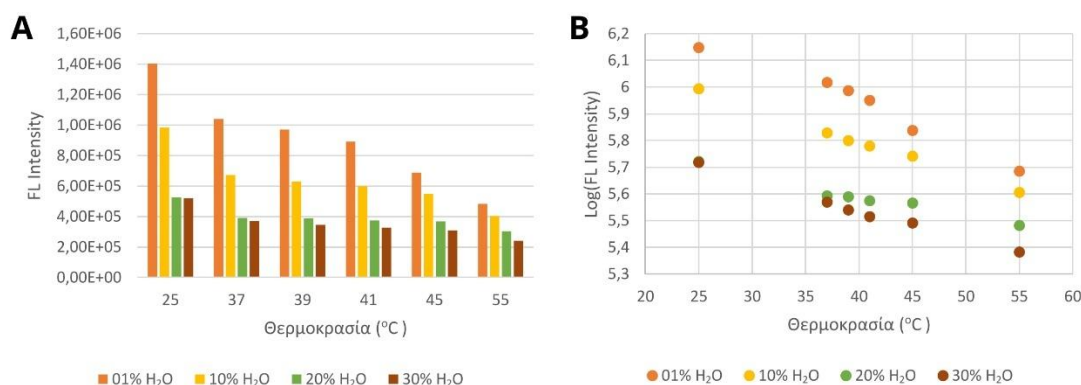


Εικόνα 134: (Α) Φάσματα απορρόφησης και (Β) φάσματα φθορισμού της ένωσης της ένωσης 7B (10 μ M) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού (από 0% έως 99% γλυκερόλη) με διέγερση στα 408 nm σε θερμοκρασία 25 $^{\circ}$ C, Step: 2, EmBW: 5, ExcBW: 5.

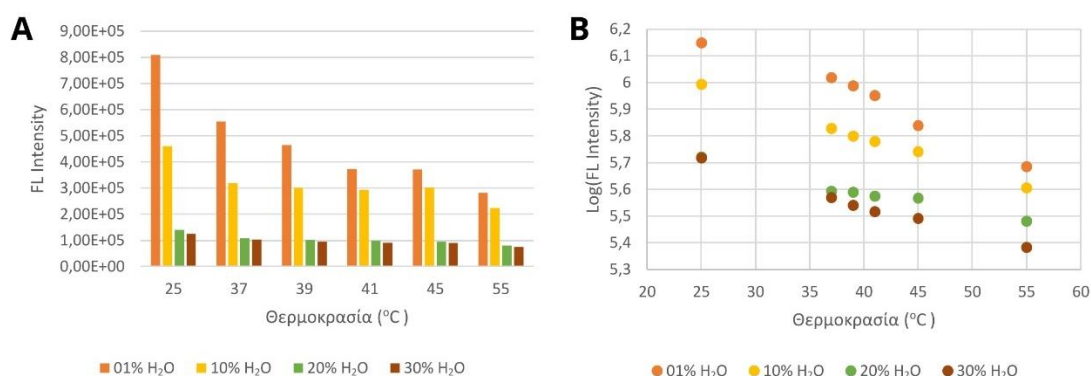


Εικόνα 135: (Α) Φάσματα απορρόφησης και (Β) φάσματα φθορισμού της ένωσης της ένωσης 7Y (10 μ M) σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού (από 0% έως 99% γλυκερόλη) με διέγερση στα 446 nm σε θερμοκρασία 25 $^{\circ}$ C, Step: 2, EmBW: 5, ExcBW: 5.

Στη συνέχεια, γνωρίζοντας πως το ιώδες επηρεάζεται σημαντικά από τη μεταβολή της θερμοκρασίας πραγματοποιήθηκαν συμπληρωματικές μελέτες σε θερμοκρασίες που αντιστοιχούν στη φυσιολογική θερμοκρασία σώματος και σε υψηλότερες που δύναται να προκαλέσουν μετουσίωση πρωτεϊνών (37 $^{\circ}$ C, 39 $^{\circ}$ C, 41 $^{\circ}$ C, 45 $^{\circ}$ C και 55 $^{\circ}$ C), στα μικρότερα ποσοστά νερού (01%, 10%, 20%, 30%), όπου το ιώδες είναι μεγαλύτερο, για τις ενώσεις **7β** και **7γ**. Από τα διαγράμματα στις εικόνες 136 και 137 βλέπουμε πως η ένταση μειώνεται όσο πάμε σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες, γεγονός που επιβεβαιώνει πως οι δυο ενώσεις ανταποκρίνονται στις μεταβολές του ιώδους και όχι στην καλύτερη διαλυτότητα των ενώσεων στην γλυκερόλη έναντι του νερού, καθώς σε μια τέτοια περίπτωση με αύξηση της θερμοκρασίας θα είχαμε ακόμη καλύτερη διαλυτότητα της ένωσης και επομένως μεγαλύτερη ένταση φθορισμού, κάτι που δεν παρατηρείται.

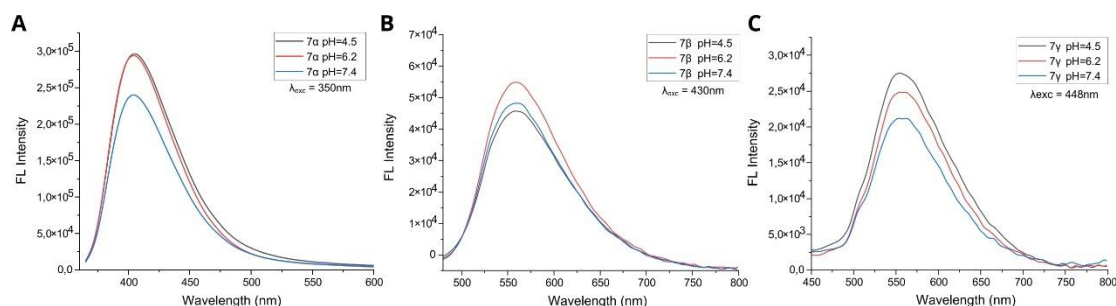


Εικόνα 136: (Α) Μεταβολή της έντασης του φθορισμού της ένωσης 7B (10 μM) με διέγερση στα 408nm σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού σε διάφορες θερμοκρασίες, (Β) Συσχέτιση του λογαρίθμου της έντασης του φθορισμού της ένωσης 7B και της θερμοκρασίας στα διαφορετικά συστήματα γλυκερόλης/νερού, με step 2, ExBw: 5, EmBw: 5.



Εικόνα 137: (Α) Μεταβολή της έντασης του φθορισμού της ένωσης 7γ (10 μM) με διέγερση στα 446nm σε διαφορετικά δυαδικά συστήματα γλυκερόλης/νερού σε διάφορες θερμοκρασίες, (Β) Συσχέτιση του λογαρίθμου της έντασης του φθορισμού της ένωσης 7γ και της θερμοκρασίας στα διαφορετικά συστήματα γλυκερόλης/νερού, με step 2, ExBw: 5, EmBw: 5.

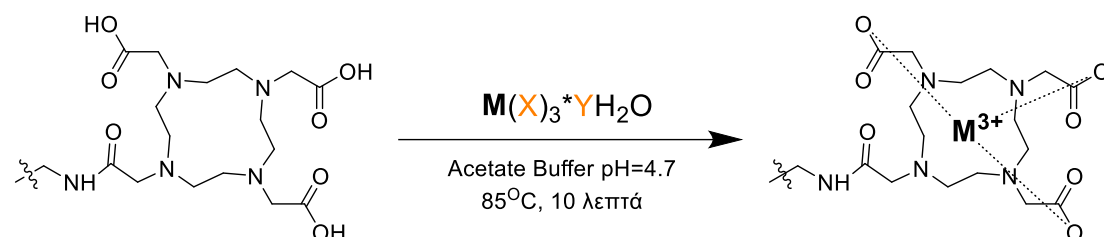
Επίσης έγιναν επιπρόσθετα πειράματα φθορισμού σε pH= 7.4 καθώς αυτή είναι η τιμή στον φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό και στο ανθρώπινο πλάσμα, σε pH=6.2 το οποίο συναντάται στο περιβάλλον του γλοιώματος και pH=4.5 το οποίο αντιστοιχεί στην τιμή στο εσωτερικό των λυσοσωμάτων^{117,118}. Για το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται στις μετρήσεις, αναμίχθηκε ποσότητα από υδατικά διαλύματα 0.1M κιτρικού οξέος και 0.2M όξινου φωσφορικού νατρίου μέχρι την επιθυμητή τιμή pH¹¹⁹. Από την Εικόνα 136 παρατηρούμε πως δεν υπάρχει σημαντική μεταβολή στην ένταση του φθορισμού σε αυτές τις τιμές pH.



Εικόνα 138: (Α) Φάσμα φθορισμού της ένωσης 7α σε pH = 4.5, 6.2, 7.4 με διέγερση στα 350nm, (Β)

Φάσμα φθορισμού της ένωσης **7b** σε pH = 4.5, 6.2, 7.4 με διέγερση στα 430nm, (C) Φάσμα φθορισμού της ένωσης **7γ** σε pH = 4.5, 6.2, 7.4 με διέγερση στα 448nm, όλα σε θερμοκρασία 25 °C, Step: 2, EmBW: 5, ExcBW: 5.

3.2 Πειράματα επισήμανσης με ψυχρά μέταλλα



Εικόνα 139: Γενική αντίδραση της επισήμανσης των ενώσεων με μέταλλα.

Η επισήμανση των ενώσεων **7α**, **7β**, **7γ** με Νεοδύμιο-144 (¹⁴⁴Nd), Ευρώπιο-152 (¹⁵²Eu), Γαδολίνιο-157 (¹⁵⁷Gd) και Τέρβιο-159 (¹⁵⁹Tb) πραγματοποιήθηκε σε Acetate buffer (0.1M, pH=4.7) με 10μl από το διάλυμα 10mM της κάθε ένωσης (1eq) και 20μl από το διάλυμα 10mM μετάλλου (2eq). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε γυάλινα φιαλίδια σε αναλογικό θερμομανδύα με ανάδευση (Thermoshaker) στους 85°C για 15 λεπτά.

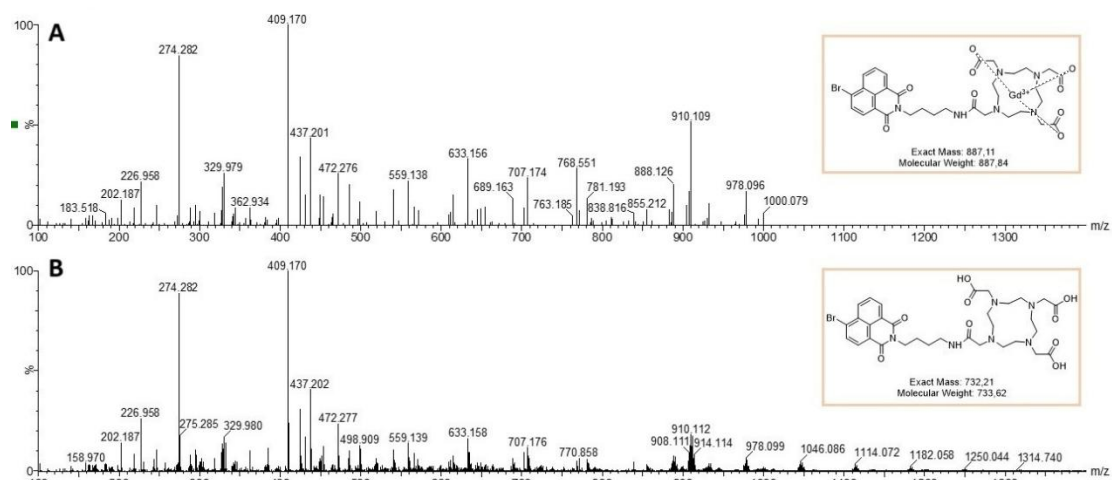
Το διάλυμα 0.1M Acetate Buffer pH=4.7 παρασκευάστηκε με διαλυτοποίηση 2.212g οξικού νατρίου (NaOAc) σε 400ml απιονισμένο H₂O. Ακολούθησε προσθήκη 1.317ml οξικού οξέος (AcOH) και ρύθμιση του pH στην επιθυμητή τιμή με στάγδην προσθήκη 6N HCl. Τέλος, έγινε αραιώση σε τελικό όγκο 500ml με απιονισμένο H₂O.

Παρασκευάστηκαν διαλύματα των ενώσεων **7α**, **7β**, **7γ** και των συμπλοκών Nd(NO₃)₃*6H₂O, Eu(NO₃)₃*6H₂O, Tb(NO₃)₃*6H₂O, Gd(OAc)₃*H₂O, με συγκέντρωση 10mM σε Acetate buffer pH=4.7 (Πίνακας 12).

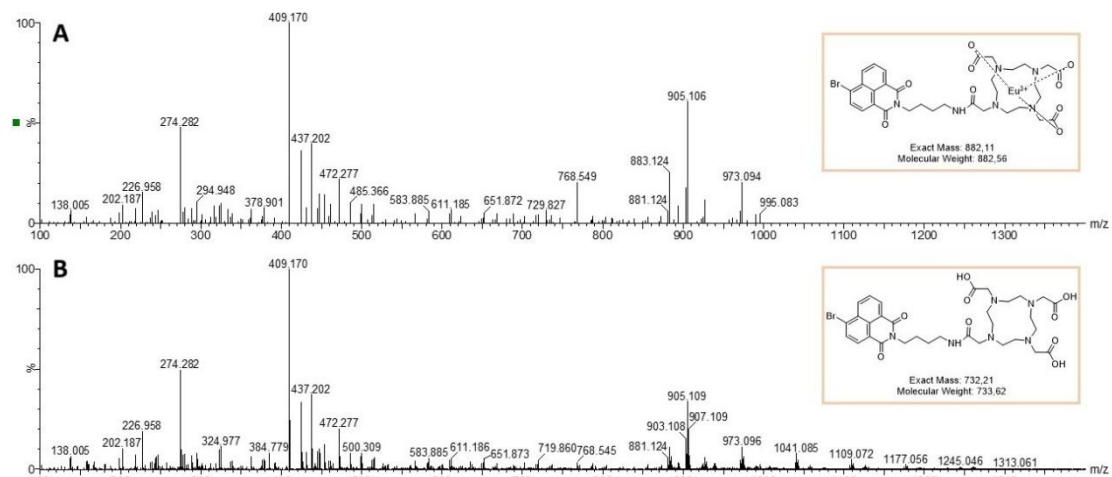
Πίνακας 12. Προετοιμασία διαλυμάτων 10mM για τις αντιδράσεις επισήμανσης.

Ένωση	Μοριακό βάρος	Ποσότητα για 500μl - 10mM
Ένωση 7α	733.21	3.67 mg
Ένωση 7β	697.79	3.49 mg
Ένωση 7γ	739.83	3.70 mg
Nd(NO ₃) ₃ *6H ₂ O	420.33	2.10 mg
Eu(NO ₃) ₃ *6H ₂ O	428.05	2.14 mg
Tb(NO ₃) ₃ *6H ₂ O	435.01	2.17 mg
Gd(OAc) ₃ *H ₂ O	352.58	1.76 mg

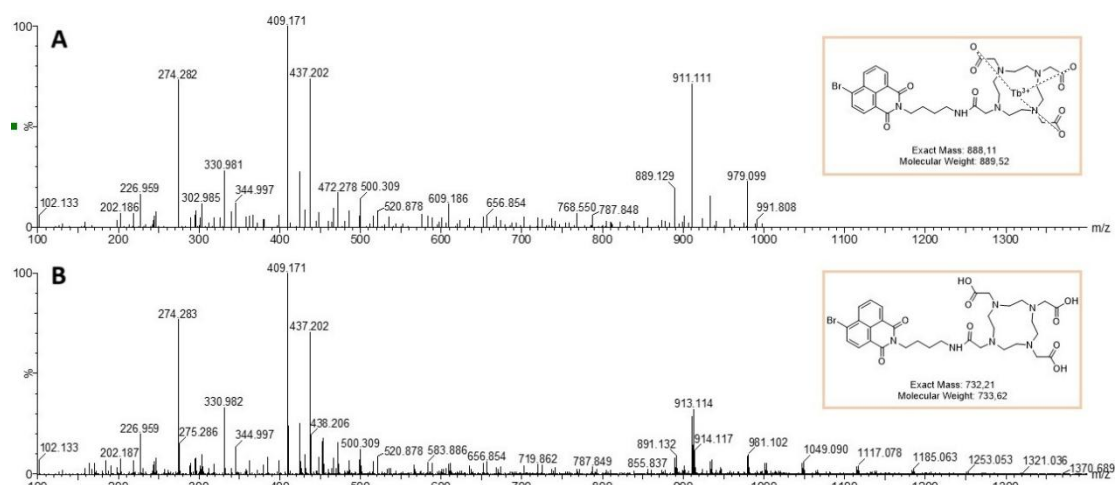
Μετά το πέρας του χρόνου, οι αντιδράσεις ελέγχθηκαν με φασματομετρία μάζας και έδειξαν επισήμανση όλων των ενώσεων και με τα τέσσερα μέταλλα σε αποδόσεις >99%



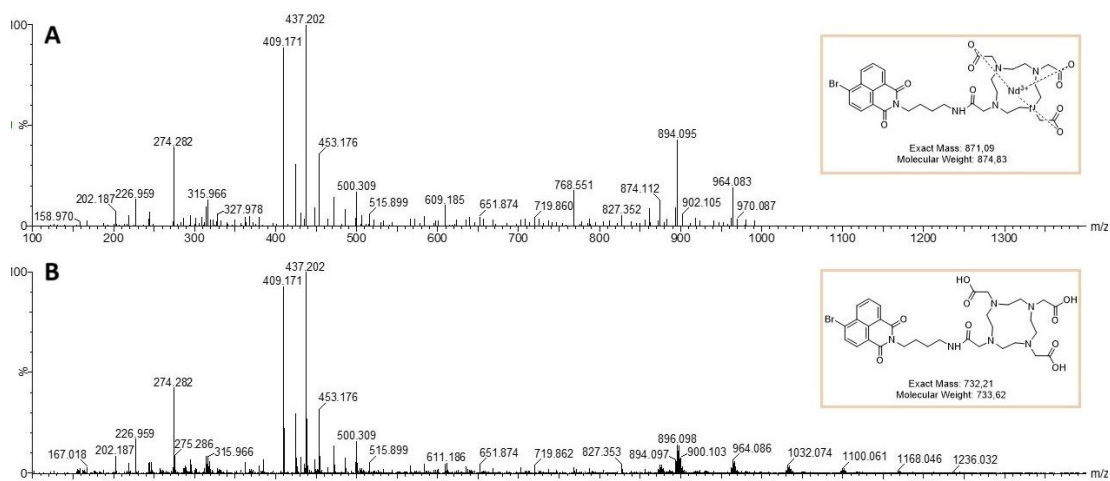
Εικόνα 140: (B) Φάσμα ESI-MS και (A) φάσμα ESI-MS με TOF Transform της ένωσης $[^{157}\text{Gd}]\text{-}7\text{a}$ με το επιθυμητό m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+=910.109$.



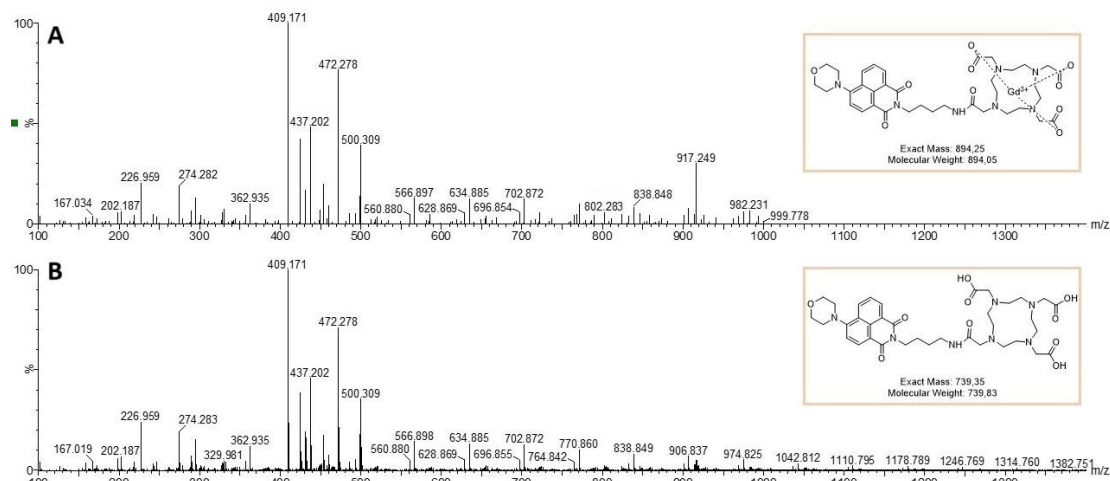
Εικόνα 141: (B) Φάσμα ESI-MS και (A) φάσμα ESI-MS με TOF Transform της ένωσης $[^{152}\text{Eu}]\text{-}7\text{a}$ με το επιθυμητό m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+=905.106$.



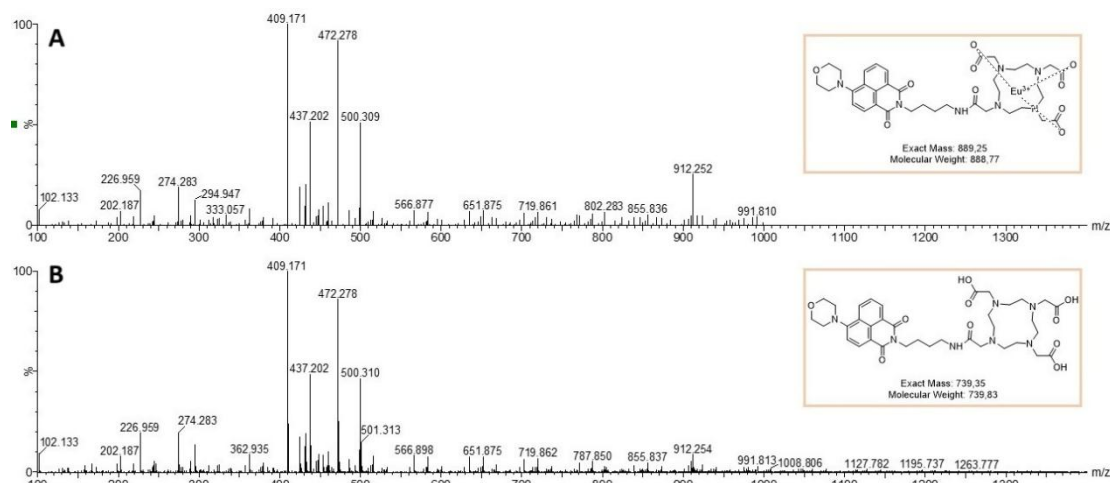
Εικόνα 142: (B) Φάσμα ESI-MS και (A) φάσμα ESI-MS με TOF Transform της ένωσης $[^{159}\text{Tb}]\text{-}7\text{a}$ με το επιθυμητό m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+=889.129$, καθώς και το $[\text{M}+\text{Na}]^+=911.111$.



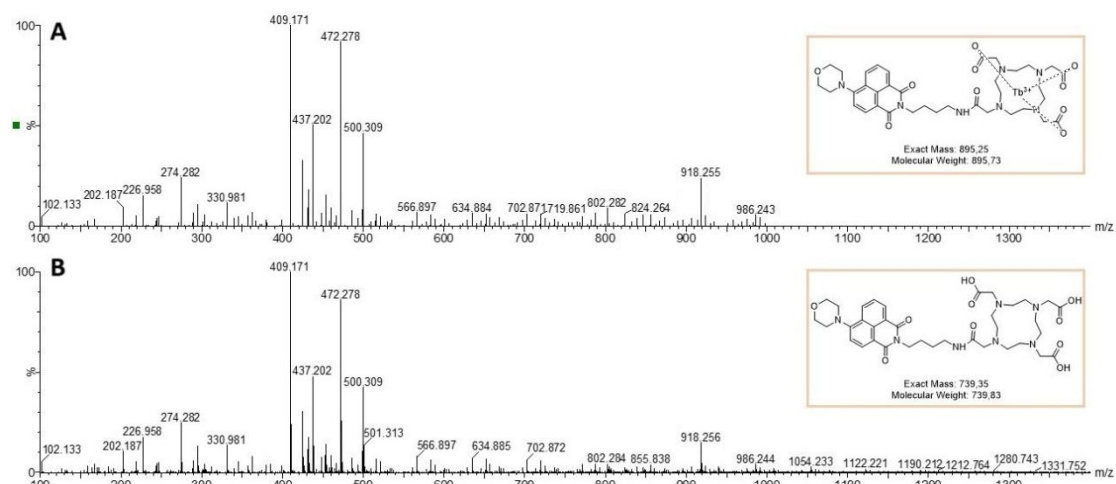
Εικόνα 143: (B) Φάσμα ESI-MS και (A) φάσμα ESI-MS με TOF Transform της ένωσης $[^{144}\text{Nd}]\text{-7a}$ με το επιθυμητό m/z : $[M+\text{Na}]^+=894.095$.



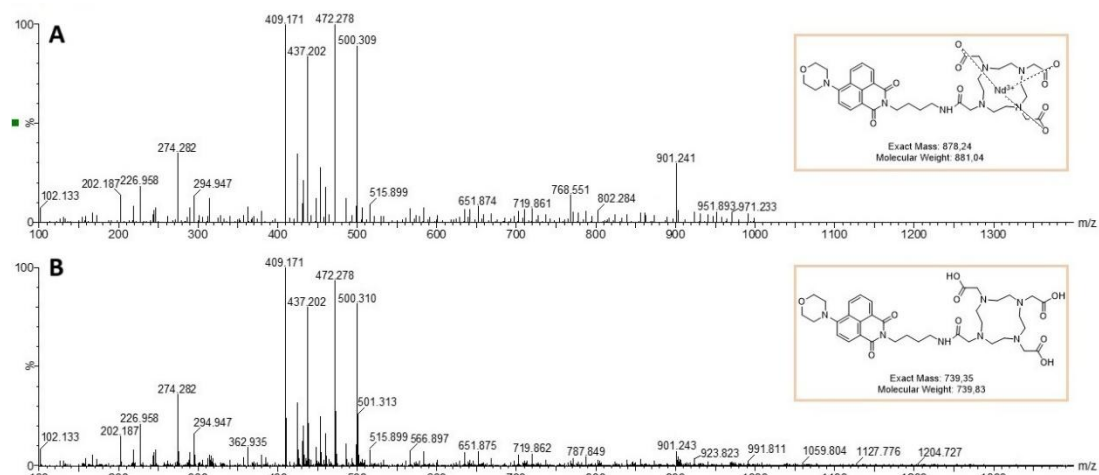
Εικόνα 144: (B) Φάσμα ESI-MS και (A) φάσμα ESI-MS με TOF Transform της ένωσης $[^{157}\text{Gd}]\text{-7b}$ με το επιθυμητό m/z : $[M+\text{Na}]^+=917.249$.



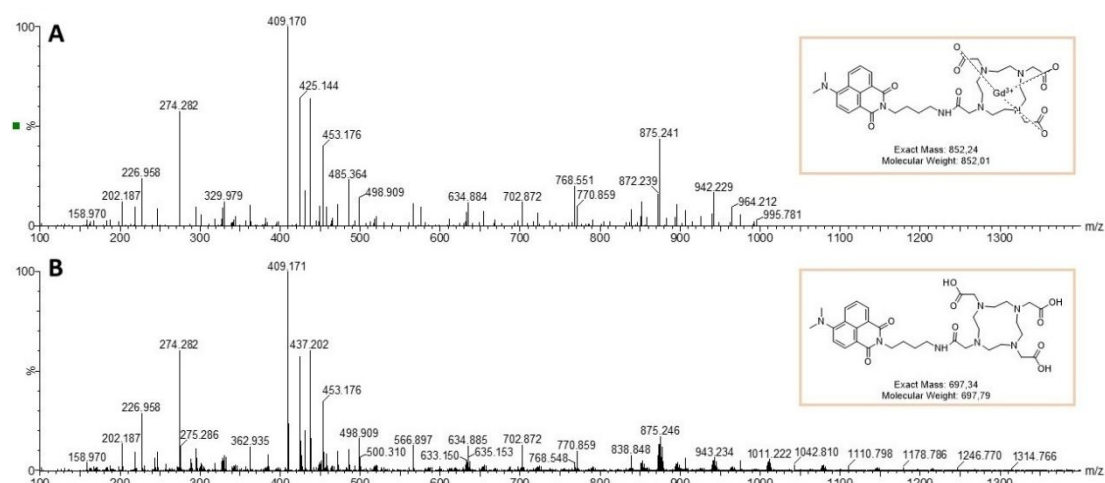
Εικόνα 145: (B) Φάσμα ESI-MS και (A) φάσμα ESI-MS με TOF Transform της ένωσης $[^{152}\text{Eu}]\text{-7b}$ με το επιθυμητό m/z : $[M+\text{Na}]^+=912.252$.



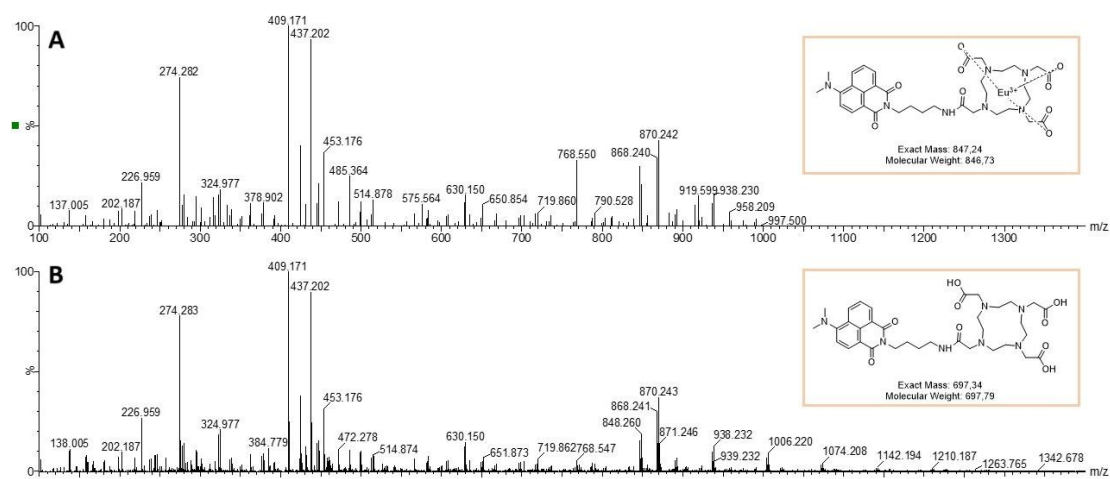
Εικόνα 146: (B) Φάσμα ESI-MS και (A) φάσμα ESI-MS με TOF Transform της ένωσης $[^{159}\text{Tb}]\text{-}7\text{b}$ με το επιθυμητό m/z : $[M+\text{Na}]^+=918.255$.



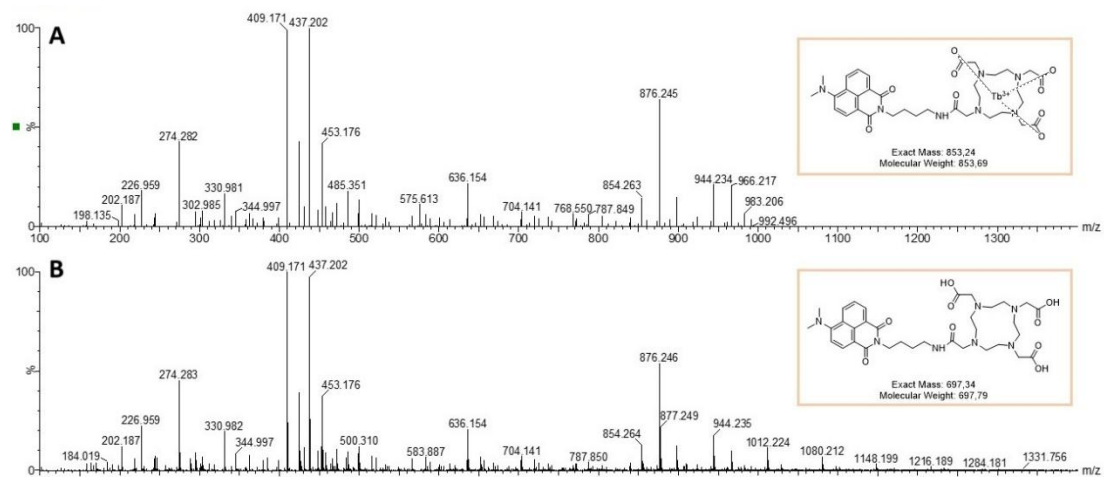
Εικόνα 147: (B) Φάσμα ESI-MS και (A) φάσμα ESI-MS με TOF Transform της ένωσης $[^{144}\text{Nd}]\text{-}7\text{b}$ με το επιθυμητό m/z : $[M+\text{Na}]^+=901.241$.



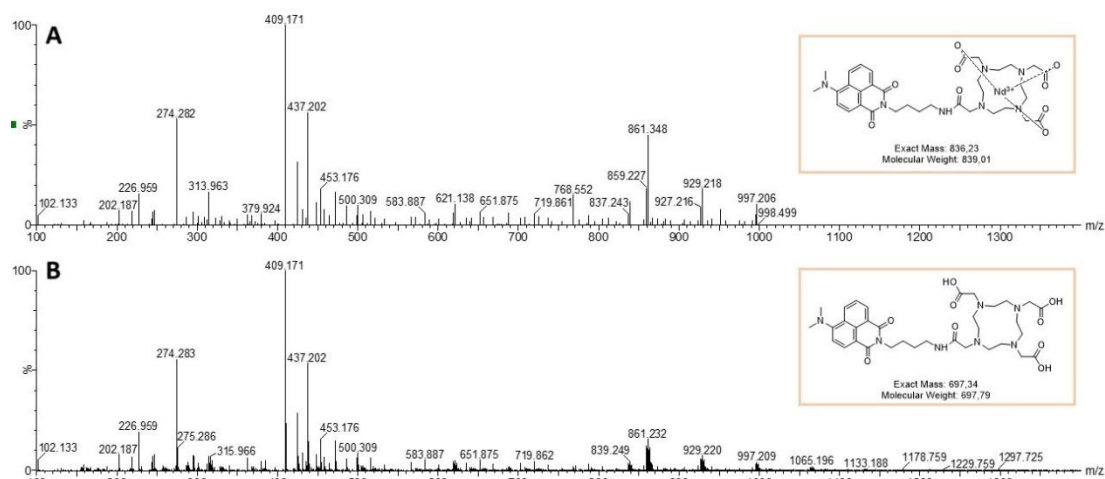
Εικόνα 148: (B) Φάσμα ESI-MS και (A) φάσμα ESI-MS με TOF Transform της ένωσης $[^{157}\text{Gd}]\text{-}7\text{g}$ με το επιθυμητό m/z : $[M+\text{Na}]^+=875.241$.



Εικόνα 149: (B) Φάσμα ESI-MS και (A) φάσμα ESI-MS με TOF Transform της ένωσης $[^{152}\text{Eu}]\text{-}7\gamma$ με το επιθυμητό m/z : $[M+\text{Na}]^+=870.242$.



Εικόνα 150: (B) Φάσμα ESI-MS και (A) φάσμα ESI-MS με TOF Transform της ένωσης $[^{159}\text{Tb}]\text{-}7\gamma$ με το επιθυμητό m/z : $[M+\text{H}]^+=573.4162$, καθώς και το $[M+\text{Na}]^+=595.3989$, $[M+\text{K}]^+=611.3638$.

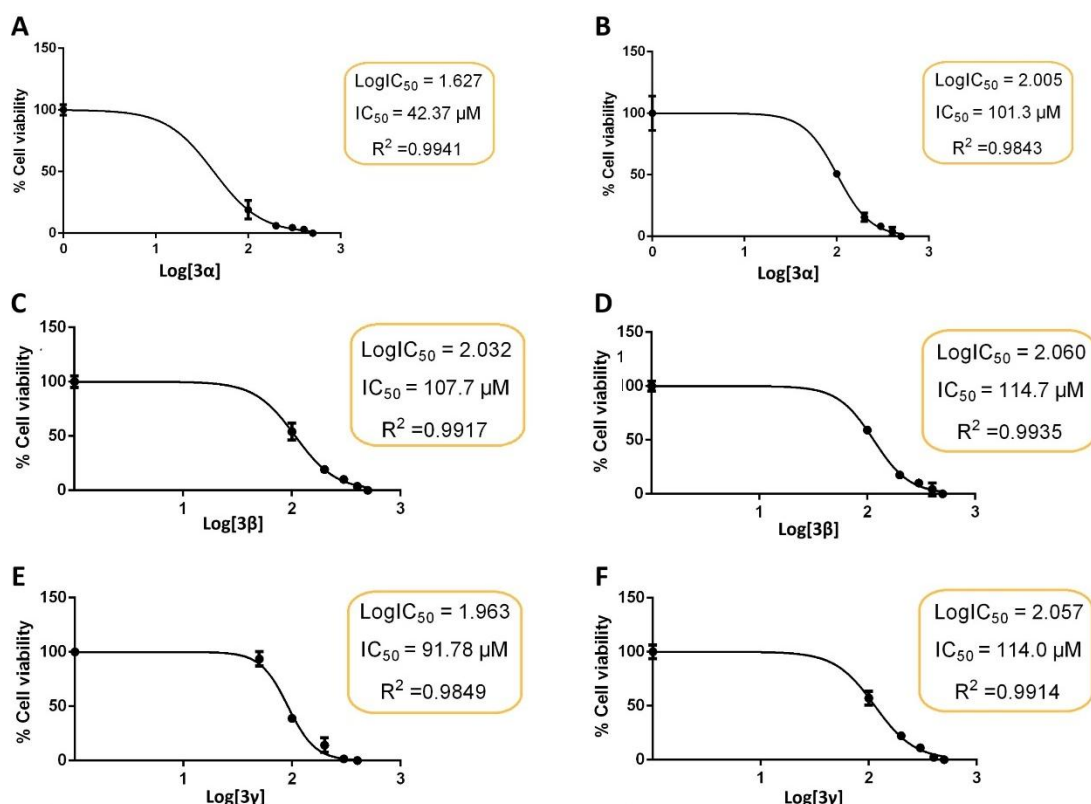


Εικόνα 151: (B) Φάσμα ESI-MS και (A) φάσμα ESI-MS με TOF Transform της ένωσης $[^{144}\text{Nd}]\text{-}7\gamma$ με το επιθυμητό m/z : $[M+\text{Na}]^+=859.227$.

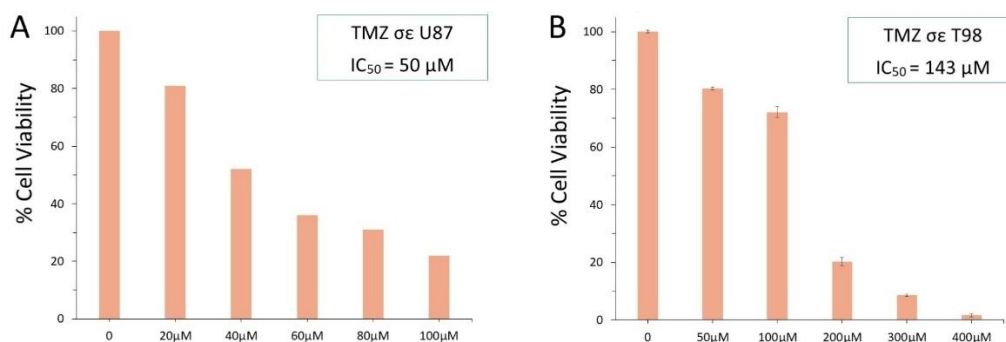
3.3 Πειράματα κυτταροτοξικότητας

Για να μελετηθεί η επίδραση των αναλόγων του 4-υποκατεστημένου-1,8-ναφθαλικού ανυδρίτη σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος T98 και U87, πραγματοποιήθηκε πείραμα αποκλεισμού με Trypan Blue. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική μείωση του αριθμού των κυττάρων σε υψηλότερες δόσεις των αναλόγων πριν τη σύζευξή του με DOTA, υποδεικνύοντας ότι έχουν κυτταροτοξική επίδραση εξαρτώμενη από την συγκέντρωση.

Και οι τρεις ενώσεις έχουν καλύτερη κυτταροτοξική επίδραση ($IC_{50}^{3\alpha}=143 \mu M$, $IC_{50}^{3\beta}=114.2 \mu M$, $IC_{50}^{3\gamma}=114 \mu M$) στην κυτταρική σειρά T98 η οποία εμφανίζει αντίσταση στην δράση της τεμοζολομίδης ¹²⁰, σε σχέση με το ίδιο το φάρμακο ($IC_{50}=143 \mu M$). Στην κυτταρική σειρά U87 η ένωση 3α είχε επίσης μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα ($IC_{50}=42.37 \mu M$) σε σχέση με την TMZ ($IC_{50}=50 \mu M$).



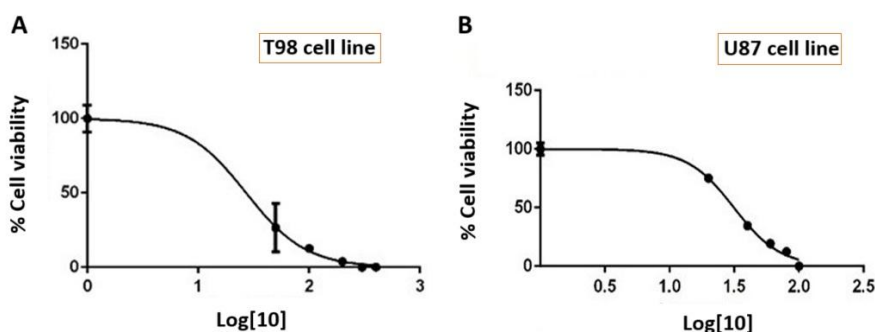
Εικόνα 152: Επίδραση σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος: (A) ένωση 3α σε U87, (B) ένωση 3α σε T98, (C) ένωση 3β σε U87, (D) ένωση 3β σε T98, (E) ένωση 3γ σε U87, (F) ένωση 3γ σε T98, 72 ώρες μετά την χορήγηση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και είναι προσαρμοσμένα σε μη θεραπευμένα κύτταρα. Οι τιμές IC_{50} υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το μη γραμμικό μοντέλο ανάλυσης οπισθοδρόμησης του GraphPad Prism 6.



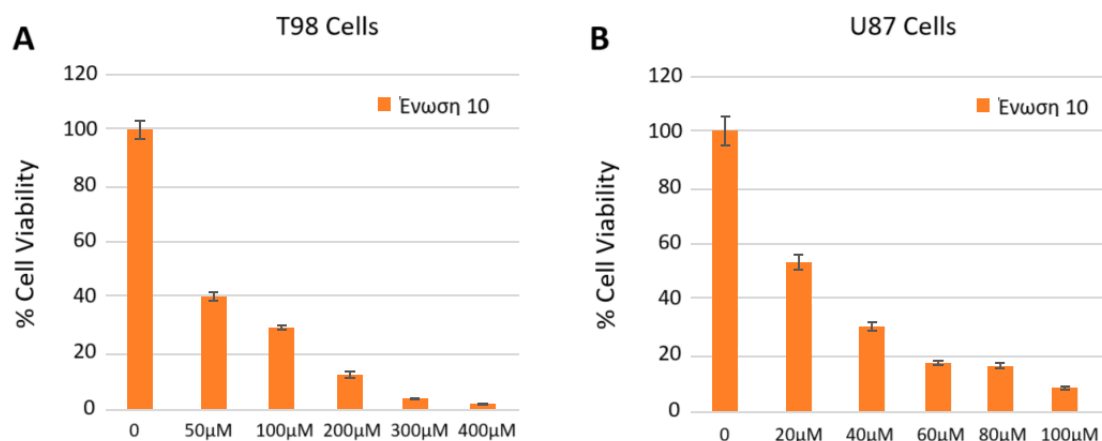
Εικόνα 153: Επίδραση της Τεμοζολομίδης σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος: (Α) U87, (Β) T98, 72 ώρες μετά την χορήγηση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και είναι προσαρμοσμένα σε μη θεραπευμένα κύτταρα. Οι τιμές IC_{50} υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το μη γραμμικό μοντέλο ανάλυσης οπισθοδρόμησης του GraphPad Prism 6.

Για την μελέτη της επίδρασης της ένωσης 10 στη βιωσιμότητα και των δύο κυτταρικών σειρών, τα κύτταρα T98 και U87 καλλιεργήθηκαν με κλιμακούμενες συγκεντρώσεις των ενώσεων για 72 ώρες και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πείραμα αποκλεισμού Trypan Blue. Τα αποτελέσματα δείχνουν επίσης μια σημαντική μείωση του αριθμού των κυττάρων σε υψηλότερες συγκεντρώσεις της ένωσης, υποδεικνύοντας ότι έχει ανασταλτική δράση εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση. Συγκεκριμένα, οι τιμές IC_{50} 72 ώρες μετά τη θεραπεία ήταν 27 μ M στην κυτταρική σειρά T98 και 30 μ M στην κυτταρική σειρά U87.

Η ένωση 10 έδωσε εκπληκτικά αποτελέσματα με κυτταροτοξικότητα στην σειρά U87 1.7 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την TMZ ενώ στην ανθεκτική T98, 5.3 φορές μεγαλύτερη. Συνεπώς η χρήση της TMZ ως κυτταροτοξικός παράγοντας στην ένωση **10** ενίσχυσε αρκετά την δράση της.



Εικόνα 154: Επίδραση σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος: (Α) ένωση 10 σε T98, (Β) ένωση 10 σε U87, 72 ώρες μετά την χορήγηση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και είναι προσαρμοσμένα σε μη θεραπευμένα κύτταρα. Οι τιμές IC_{50} υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το μη γραμμικό μοντέλο ανάλυσης οπισθοδρόμησης του GraphPad Prism 6



Εικόνα 155: Επίδραση της ένωσης 10 στις κυτταρικές σειρές T98 (A) και U87 (B) 72 ώρες μετά τη χορήγηση. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και είναι προσαρμοσμένα σε μη θεραπευμένα κύτταρα. Οι τιμές IC_{50} υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το μη γραμμικό μοντέλο ανάλυσης οπισθοδρόμησης του GraphPad Prism 6.

Λόγω της κυτταροτοξικότητας της ένωσης 10, ακολούθησε *in vivo* προσδιορισμός της τοξικότητας σε φυσιολογικό οργανισμό, σε πειραματικά μοντέλα zebrafish.

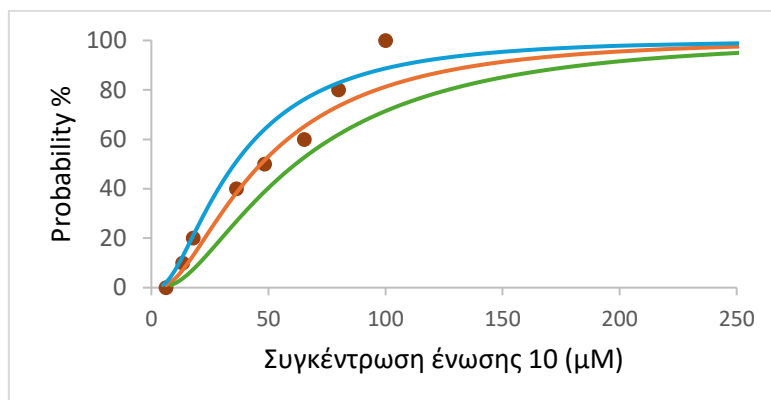
Ενήλικα ψάρια zebrafish άγριου τύπου (AB) διατηρήθηκαν σε ειδικό χώρο εκτροφής, με ανακυκλούμενο σύστημα νερού, σε θερμοκρασία 28 ± 1 °C, με pH 6,5–7,5 και αγωγιμότητα νερού 500 ± 50 $\mu S/cm$, υπό φωτοπερίοδο 14 ωρών φωτός / 10 ωρών σκότους (με το φως να ανάβει στις 8:00 π.μ.). Η σίτιση των ψαριών γινόταν δύο φορές την ημέρα με τροφή για zebrafish (Zebrafeed, Sparos). Για την αναπαραγωγή χρησιμοποιήθηκαν σεξουαλικά ώριμα zebrafish (τουλάχιστον τριών μηνών).

Η συλλογή των αυγών πραγματοποιήθηκε στην αρχή της φάσης φωτός των 14 ωρών, μετά τη διαδικασία ζευγαρώματος που έλαβε χώρα κατά τη διάρκεια της νύχτας. Μετά τον έλεγχο τους, τα μη γονιμοποιημένα αυγά και εκείνα που παρουσίαζαν αναπτυξιακές ανωμαλίες απομακρύνθηκαν. Η διαδικασία αφαίρεσης του χορίου των αυγών πραγματοποιήθηκε στις 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (hrf).

Τα αποχωριόμενα έμβρυα τοποθετήθηκαν σε πλάκες καλλιέργειας 24 θέσεων (2 έμβρυα ανά θέση, με 1.5 mL διαλύματος ανά θέση), και κάθε πείραμα διεξήχθη τρεις φορές. Πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικές δοκιμές για την αξιολόγηση του εύρους 0%-100% θνησιμότητας. Το DMSO (0.1%) χρησιμοποιήθηκε τόσο ως διαλύτης όσο και ως control. Στην παρούσα μελέτη δοκιμάστηκαν επτά διαφορετικές συγκεντρώσεις της ένωσης 10 (0.0, 10.0, 20.0, 40.0, 60.0, 80.0 και 100.0 μM). Συνολικά μελετήθηκαν 881 έμβρυα, εκ των οποίων τα 96 ανήκαν στην ομάδα μη-έκθεσης. Από την τελευταία, έξι (6) έμβρυα βρέθηκαν νεκρά. Κάθε πείραμα διήρκεσε 96 ώρες μετά τη γονιμοποίηση και ξεκίνησε στις 24 hrf.

Απαραίτητη είναι η εφαρμογή οξείας δοκιμής με βραχυχρόνια έκθεση (96 hrf) στην ένωση 10, ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση που είναι θανατηφόρα για το 50% των εμβρύων (θανατηφόρα δόση, LD_{50}). Αυτό αποτελεί σημαντικό δείκτη οξείας τοξικότητας στα ψάρια. Σύμφωνα με τον ΟΟΣΑ (2010), ενδείξεις θανάτου ενός εμβρύου περιλαμβάνουν την πήξη του, την απουσία σχηματισμού σωματίων, τη μη αποκόλληση της ουράς και/ή την απουσία καρδιακού παλμού. Οι δοκιμές τοξικότητας (LD_{50}) και τα όρια LD_{25} και LD_{75} υπολογίστηκαν με βάση τη σωρευτική θνησιμότητα στο τέλος του πειράματος (96 hrf). Οι τιμές LD_{50} προσδιορίστηκαν μέσω Regression Probit ανάλυσης.

Η τοξική επίδραση της ένωσης **10** εξαρτάται από την συγκέντρωση. Το ποσοστό θνησιμότητας αυξάνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 154. Η συγκέντρωση θανατηφόρας δόσης υπολογίστηκε σε $LD_{50}=46.81 \mu M$ ενώ οι τιμές LD_{25} και LD_{75} ήταν $35.54 \mu M$ και $61.64 \mu M$, αντίστοιχα. Συμπερασματικά, τα ποσοστά θνησιμότητας αυξάνονται σε συγκεντρώσεις πολύ υψηλότερες από τις τιμές IC_{50} στα κύτταρα γλοιώματος, υποδηλώνοντας την ύπαρξη ενός ευνοϊκού θεραπευτικού παράθυρου για κλινική αξιολόγηση της ένωσης **10**.

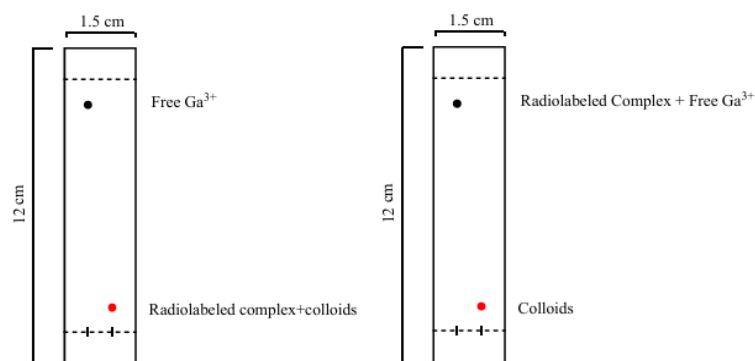


Εικόνα 156: Απόκριση τοξικότητας της ένωσης **10** σε διάφορες συγκεντρώσεις της, για έμβρυα *zebrafish* 96 hpf.

3.4 Πειράματα ραδιοεπισήμανσης και *in vitro* σταθερότητας

3.4.1 Ραδιοεπισήμανση των ενώσεων **7α**, **7β**, **7γ** με Γάλλιο-68 (^{68}Ga)

Για την ραδιοεπισήμανση με Γάλλιο-68, η ένωση **7α** διαλύθηκε σε 2% DMSO/ traced free H_2O , ενώ οι **7β** και **7γ** διαλύθηκαν σε trace free H_2O , ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 1 mg/mL . Για τη διαδικασία της ραδιοεπισήμανσης, 20 nmol από την κάθε ένωση προστέθηκαν σε $350 \mu L$ Sodium Acetate Buffer pH 4. Τέλος, προστέθηκαν $100 \mu L$ $[^{68}Ga]GaCl_3$ ($\sim 10\text{-}30 \text{ MBq}$) και τα δείγματα επώαστηκαν στους $90^\circ C$ για 30 λεπτά (τελικό pH 3.5-4). Το ποσοστό της επισήμανσης προσδιορίστηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας με χαρτί χρωματογραφίας μικροϊνών ITLC-SG. Ως κινητές φάσεις χρησιμοποιήθηκαν κιτρικό οξύ 0.1 M και οξικό αμμώνιο: μεθανόλη (1:1). Περίπου $5 \mu L$ των ραδιοεπισημασμένων συμπλόκων εφαρμόστηκαν στο σημείο εφαρμογής του χαρτιού ITLC-SG ($1.5 \times 12 \text{ cm}$) και αφέθηκαν να στεγνώσουν. Στο σύστημα του κιτρικού οξέος, το ελεύθερο Ga^{3+} μεταναστεύει στο πάνω μέρος ($R_f = 0.8 - 1.0$) του χαρτιού ITLC αφήνοντας το ραδιοεπισημασμένο σύμπλοκο καθώς και ^{68}Ga -κολλοειδή στο κάτω μέρος ($R_f = 0.0 - 0.2$). Στο σύστημα οξικό αμμώνιο: μεθανόλη (1:1), το ελεύθερο Ga^{3+} και το ραδιοεπισημασμένο σύμπλοκο μεταναστεύουν στο πάνω μέρος ($R_f = 0.8 - 1.0$) του χαρτιού ITLC αφήνοντας τα ^{68}Ga -κολλοειδή στο κάτω μέρος ($R_f = 0.0 - 0.2$).

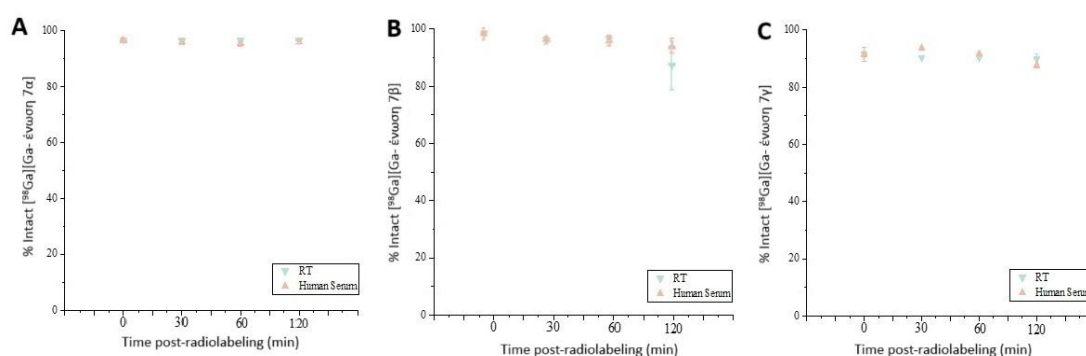


Εικόνα 157: Χρωματογραφική ανάλυση για τον προσδιορισμό του ελεύθερου Ga^{3+} , του ραδιοεπισημασμένου συμπλόκου και των κολλοειδών.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ραδιοεπισήμανση των ενώσεων ήταν επιτυχής, με απόδοση μεγαλύτερη του 90%. Δε διαπιστώθηκε ανάγκη για περαιτέρω καθαρισμό των δειγμάτων, και ως εκ τούτου οι ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν απευθείας για μελέτες σταθερότητας.

3.4.2 Μελέτες *in vitro* σταθερότητας των ενώσεων 7α, 7β, 7γ με Γάλλιο-68 (^{68}Ga)

Σε επόμενο βήμα εξετάστηκε η *in vitro* σταθερότητα των ραδιοεπισημασμένων συμπλόκων σε ανθρώπινο ορό και σε θερμοκρασία δωματίου (bench stability). Για την αξιολόγηση της σταθερότητας σε ανθρώπινο ορό, 50 μL καθενός εκ των συμπλόκων του ^{68}Ga , προστίθενται 450 μL ανθρώπινου ορού. Τα διαλύματα επωάζονται στους 37°C έως 2 ώρες. Σε χρονικά διαστήματα 30 λεπτά, 1 και 2 ώρες λαμβάνονται 5-10 μL από το κάθε δείγμα και αξιολογούνται με χρωματογραφία ITLC-SG όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται παρακάτω (Εικόνα 158).



Εικόνα 158: Ποσοστά ραδιοχημικής σταθερότητας των ενώσεων 7α (A), 7β (B) και 7γ (C), επισημασμένων με ^{68}Ga σε ανθρώπινο ορό και θερμοκρασία δωματίου σε διαφορετικούς χρόνους επώασης

Τα ραδιοεπισημασμένα σύμπλοκα παρουσίασαν ικανοποιητική *in vitro* σταθερότητα τόσο σε θερμοκρασία δωματίου όσο και στην παρουσία περίσσειας ανθρώπινου ορού για έως και 2 ώρες χωρίς να σχηματίζονται κολλοειδή. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την ισχυρή δέσμευση του ^{68}Ga στα μόρια, ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο την πιθανή χρήση τους ως διαγνωστικούς παράγοντες για απεικόνιση PET.

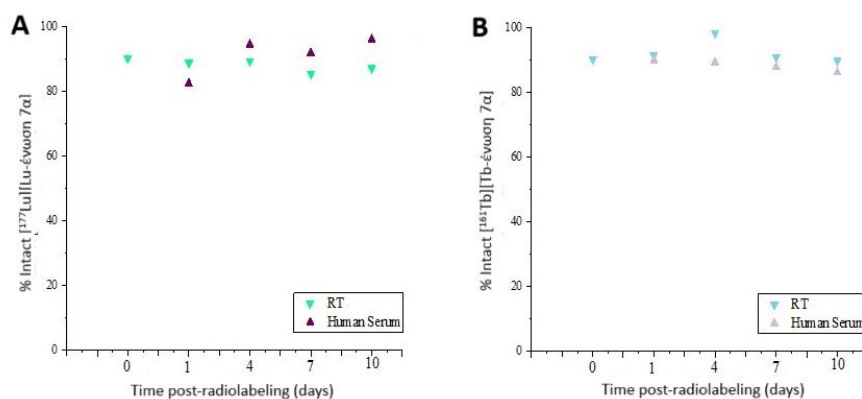
3.4.3 Ραδιοεπισήμανση της ένωσης **7a** με Τέρβιο-161 (¹⁶¹Tb) και Λουτέσιο-177 (¹⁷⁷Lu)

Η ένωση **7a** διαλύθηκε σε 2% DMSO/ trace free H₂O, με τελική συγκέντρωση το 1 mg/mL. Για την ραδιοεπισήμανση χρησιμοποιήθηκαν 20 nmol (20 μL από το αρχικό διάλυμα) από την ένωση, 300 μL sodium acetate buffer (pH 4.9) και 7-10 MBq [¹⁷⁷Lu]LuCl₃ ή [¹⁶¹Tb]TbCl₃. Το δείγμα επώαστηκε στους 90°C για 60 λεπτά και το ποσοστό της ραδιοεπισήμανσης αξιολογήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας χρησιμοποιώντας χαρτί χρωματογραφίας μικροϊνών ITLC-SG. Μετά την ραδιοεπισήμανση, το μόριο χρειάστηκε καθαρισμό μέσω Sep-Pak C18 cartridge φίλτρου. Το φίλτρο ενεργοποιήθηκε με 5 mL αιθανόλης absolute (EtOH) και στη συνέχεια με 5 mL double-distilled H₂O. Το δείγμα αραιώθηκε σε sodium acetate buffer (pH 4.9) μέχρι να επιτευχθεί τελικός όγκος 1 mL και διήλθε αργά από το φίλτρο. Ακολούθησε έκπλυση της στήλης με 2 mL double distilled H₂O και τελικά η έκλυση των επισημασμένων μορίων που συγκρατήθηκαν στη στήλη πραγματοποιήθηκε με 1 mL αιθανόλης absolute. Οι κινητές φάσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον χρωματογραφικό έλεγχο ήταν κιτρικό οξύ 0.1 M και διάλυμα οξικού αμμωνίου:μεθανόλης (1:1). Ποσότητα 3–5 μL δείγματος εφαρμόστηκε στο σημείο εκκίνησης του χρωματογραφικού χαρτιού ITLC-SG (1,5 x 12 cm). Όταν χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση το διάλυμα κιτρικού αμμωνίου, το χαρτί αφέθηκε να στεγνώσει πριν την ανάπτυξη. Αντίθετα, για το εναλλακτικό σύστημα, δεν χρειαζόταν να στεγνώσει η σταγόνα του δείγματος πριν την εκτέλεση της χρωματογραφικής ανάλυσης. Στο σύστημα του κιτρικού οξέος, το ελεύθερο Lu³⁺ ή Tb³⁺ μεταναστεύει στο επάνω μέρος (R_f = 0.8 – 1.0) του χαρτιού ITLC-SG αφήνοντας το ραδιοεπισημασμένο σύμπλοκο και πιθανά κολλοειδή ¹⁶¹Tb και ¹⁷⁷Lu στο κάτω μέρος (R_f = 0.0 – 0.2) του χαρτιού ITLC-SG. Στο σύστημα οξικού αμμωνίου:μεθανόλης (1:1), το ελεύθερο Lu³⁺ ή Tb³⁺ και το ραδιοεπισημασμένο σύμπλοκο μεταναστεύουν στο πάνω μέρος (R_f = 0.8 – 1.0), ενώ στο κάτω μέρος (R_f = 0.0 – 0.2) αξιολογούνται τα κολλοειδή.

Τα αποτελέσματα της ραδιοεπισήμανσης ήταν εξαιρετικά, με ποσοστό πάνω από 90% επομένως τα δείγματα αξιολογήθηκαν περαιτέρω για μελέτες σταθερότητας.

3.4.4 Μελέτες *in vitro* σταθερότητας της **7a** με Τέρβιο-161 (¹⁶¹Tb) και Λουτέσιο-177 (¹⁷⁷Lu)

Η *in vitro* σταθερότητα της ένωσης **7a** εξετάστηκε σε ανθρώπινο ορό και σε θερμοκρασία δωματίου για χρονικό διάστημα 10 ημερών. Για την αξιολόγηση της σταθερότητας στον ανθρώπινο ορό, 50 μL του ραδιοεπισημασμένου συμπλόκου, προστέθηκαν σε 450 μL ανθρώπινου ορού (1:10). Το διάλυμα επώαστηκε στους 37°C έως 10 ημέρες. Σε χρονικά διαστήματα, π.χ., 1, 4, 7 και 10 ημερών λαμβάνεται ποσότητα 3-5 μL από το κάθε δείγμα και αξιολογείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (Εικόνα 159).



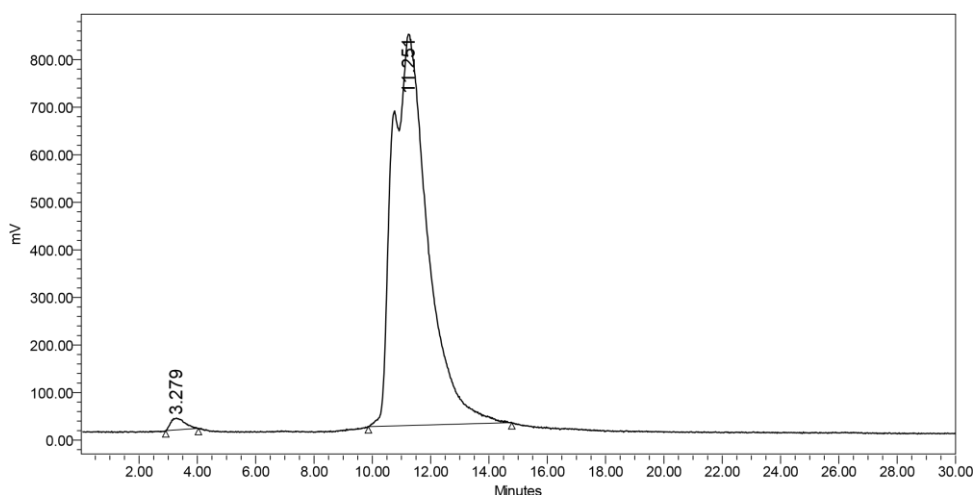
Εικόνα 159: Ποσοστά ραδιοχημικής σταθερότητας της ένωσης **7a** επισημασμένης με ¹⁷⁷Lu (A) και ¹⁶¹Tb (B) σε ανθρώπινο ορό και θερμοκρασία δωματίου σε διαφορετικούς χρόνους επώασης

Η ραδιοεπισημασμένη ένωση **7a** παρουσίασε ικανοποιητική σταθερότητα σε θερμοκρασία δωματίου (RT), καθώς και παρουσία ανθρώπινου ορού, όπως διαπιστώθηκε με radio-TLC για έως και 10 μέρες χωρίς να σχηματίζονται κολλοειδή. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τη δυνατότητα των ραδιοεπισημασμένων συμπλόκων για παρατεταμένες θεραπευτικές εφαρμογές.

3.4.5 Ραδιοεπισήμανση της ένωσης **10** με Τεχνητίο-99m (^{99m}Tc)

Το πρόδρομο σύμπλοκο [^{99m}Tc][Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺ παρασκευάστηκε ως εξής. Ένα φιαλίδιο που περιείχε 4 mg Na₂CO₃, 20 mg τρυγικού νατρίου και 7 mg NaBH₄ σφραγίστηκε και εξαερώθηκε με αέριο CO για 2 λεπτά πριν προστεθεί 1 mL διαλύματος Na[^{99m}Tc]TcO₄, το οποίο προήλθε από γεννήτρια ⁹⁹Mo/^{99m}Tc. Το γυάλινο φυαλίδιο θερμάνθηκε στους 115 °C για 30 λεπτά και μετά το τέλος της αντίδρασης αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, το διάλυμα ρυθμίστηκε σε pH 6.5–7 με προσθήκη διαλύματος HCl 1M. Η δημιουργία του [^{99m}Tc][Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺ επιβεβαιώθηκε με αντίστροφης φάσης υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (RP-HPLC) σε στήλη C18-RP, χρησιμοποιώντας γραμμική αύξηση από 0% έως 100% του διαλύτη B σε διάστημα 30 λεπτών και με ρυθμό ροής 1 mL/min, όπου ο διαλύτης A ήταν H₂O με 0,1% TFA και ο διαλύτης B ήταν MeOH με 0,1% TFA. Η ραδιενέργεια του πρόδρομου μετρήθηκε με δοσιμετρητή.

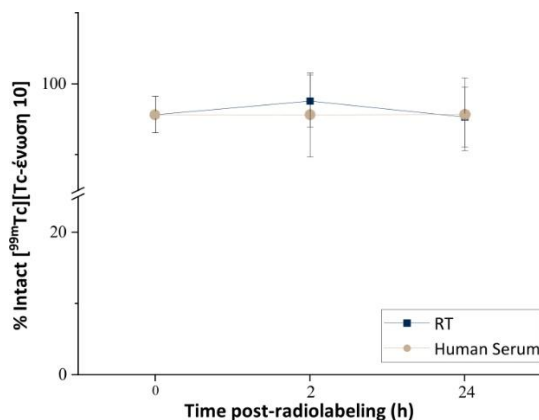
Η ραδιοσήμανση της ένωσης **10** με το [^{99m}Tc][Tc(CO)₃(OH)₂]⁺ επιτεύχθηκε μετά από 45 λεπτά στους 40°C. Οι ραδιοχημική απόδοση ήταν > 95%, η οποία υπολογίστηκε με HPLC αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) σε στήλη C18-RP με σύστημα διαλυτών από 0% έως 100% B σε διάστημα 30 λεπτών με ρυθμό ροής 1 mL/min, όπου A : H₂O/0,1% TFA και ο B : MeOH/0,1% TFA, με ρυθμό ροής 1 mL/min. Το επισημασμένο προϊόν χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.



Εικόνα 160: Χρωματογράφημα HPLC του $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc-ένωση } 10]$. Ο χρόνος κατακράτησης είναι $\sim 4\text{-}6\text{ min}$ για το $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$ και $\sim 3\text{ min}$ για το $[^{99m}\text{Tc}][\text{TcO}_4]^-$. Η κορυφή στα 12.251min αντιστοιχεί στο $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc-ένωση } 10]$.

3.4.6 Μελέτες *in vitro* σταθερότητας τη ένωσης 10 με Τεχνητίο-99m (^{99m}Tc)

Η *in vitro* σταθερότητα της ένωσης **10** εξετάστηκε σε ανθρώπινο ορό και σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι και 24 ώρες μετά την επισήμανση. Για την αξιολόγηση της σταθερότητας στον ανθρώπινο ορό, 50 μL του ραδιοεπισημασμένου συμπλόκου, προστέθηκαν σε 450 μL ανθρώπινου ορού (1:10). Τα δείγματα επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες. Στη συνέχεια, στις 2 και 24 ώρες μετά την έναρξη της επώασης, 100 μL από κάθε μείγμα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με 200 μL αιθανόλης και φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά για να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες του ορού. Τα υπερκείμενα αφαιρέθηκαν και αναλύθηκαν με HPLC. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις φορές.



Εικόνα 161: Ποσοστά ραδιοχημικής σταθερότητας του $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc-ένωση } 10]$ σε ανθρώπινο ορό και θερμοκρασία δωματίου έως 24 ώρες επώασης.

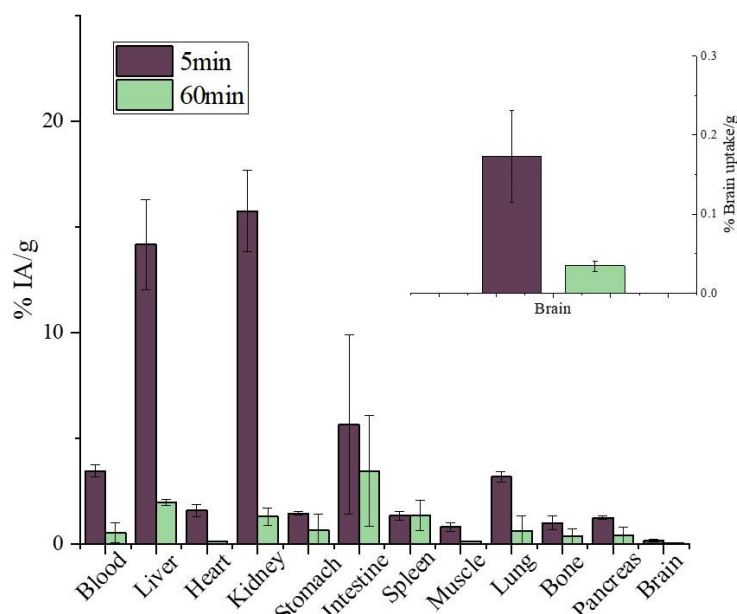
Η ραδιοεπισημασμένη ένωση παρέμεινε σταθερή σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 24 ώρες. Επίσης ήταν σταθερό σε ανθρώπινο ορό έως και 24 ώρες μετά την ραδιοσήμανση (Εικόνα 161).

3.5 Πειράματα *in vivo* βιοκατανομής

Η *in vivo* κινητική του ραδιοεπισημασμένων μορίων αξιολογήθηκε σε φυσιολογικά ποντίκια CFW (Carworth Farms Webster), 6-8 εβδομάδων και με μέσο βάρος 30-40 g. Τα ζώα φιλοξενήθηκαν σε αεριζόμενα κλουβιά (IVC) υπό κύκλο φωτός/σκοταδιού 12 ωρών, με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Το ραδιοεπισημασμένο μόριο διαλύθηκε σε ~1100μL φυσιολογικού ορού με 10% EtOH. Κάθε ποντίκι έλαβε ενδοφλεβίως 100 μL/~0.3 MBq της ραδιοεπισημασμένης ένωσης για το [¹⁶¹Tb]Tb-7α και 100 μL/~3,7 MBq για το [^{99m}Tc]Tc-10, οι ποσότητες των οποίων μετρήθηκε σε μετρητή δόσεων ραδιενέργειας. Σε χρόνο 5 και 60 λεπτά μετά τη χορήγηση για το [¹⁶¹Tb]Tb-7α, 1 και 24 ώρες για το [^{99m}Tc]Tc-10, τα ζώα υποβλήθηκαν σε ευθανασία με εισπνοή ισοφλουρανίου και τα κύρια όργανα και ιστοί συλλέχθηκαν, ζυγίστηκαν και μετρήθηκαν σε αυτόματο μετρητή ακτινοβολίας γάμμα. Για τον υπολογισμό της χορηγούμενης δόσης σε κάθε ζώο, παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα (standard solution) και επίσης αφαιρέθηκε η ραδιενέργεια που παρέμεινε στην ουρά. Οι σύριγγες μετρήθηκαν πριν και μετά την ένεση ώστε να προσδιοριστεί η ακριβής δόση που χορηγήθηκε σε κάθε ποντίκι. Όλες οι μετρήσεις διορθώθηκαν ως προς την ακτινοβολία υποβάθρου και τη ραδιενεργό διάσπαση. Όλα τα δεδομένα κατανομής υπολογίστηκαν ως ποσοστό της χορηγούμενης δόσης ανά γραμμάριο ιστού (%IA/g).

3.5.1 Αποτελέσματα [¹⁶¹Tb]Tb-7α

Τα αποτελέσματα βιοκατανομής (Εικόνα 162 και Πίνακας 13) δείχνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των υπό εξέταση χρονικών σημείων (5 & 60 λεπτά). Το ραδιοεπισημασμένο μόριο συσσωρεύεται κυρίως στο ήπαρ και τα νεφρά. Σημαντικά ποσοστά παρατηρούνται επίσης στο στομάχι και στο έντερο πιθανώς λόγω εκκαθάρισης της ουσίας μέσω της γαστρεντερικής οδού. Το ποσοστό πρόσληψης της ουσίας στον εγκέφαλο, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς διατηρείται σε σχετικά παρόμοια επίπεδα στα 5 και 60 λεπτά ενώ παράλληλα τα ποσοστά στο αίμα μειώνονται σημαντικά στην μια ώρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του λόγου εγκέφαλος/αίμα (Πίνακας 14) και οδηγεί σε μικρότερη ενεργότητα υποβάθρου, κάτι το οποίο είναι επιθυμητό όταν η ραδιοεπισημασμένη ένωση πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για απεικόνιση.



Εικόνα 162: Εx νίνο βιοκατανομή μετά από ενδοφλέβια χορήγηση της $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb-7a}$ σε CFW ποντίκια, εκφρασμένη σε % IA/g ($n = 3$).

Πίνακας 13: Αποτελέσματα της ex νίνο βιοκατανομής στα 5 και 60 λεπτά μετά την χορήγηση ($n = 3 \pm \text{SD}$).

Organ	5min	60min
Blood	3.46 ± 0.27	0.53 ± 0.46
Liver	14.17 ± 2.12	1.96 ± 0.16
Heart	1.58 ± 0.29	0.12 ± 0.01
Kidney	15.76 ± 1.92	1.30 ± 0.41
Stomach	1.45 ± 0.10	2.48 ± 1.30
Intestine	7.93 ± 2.19	4.06 ± 2.13
Spleen	1.33 ± 0.20	1.36 ± 0.72
Muscle	0.80 ± 0.20	0.14 ± 0.02
Lung	3.18 ± 0.24	0.63 ± 0.71
Bone	1.00 ± 0.31	0.35 ± 0.036
Pancreas	1.24 ± 0.09	0.40 ± 0.39
Brain	0.17 ± 0.06	0.03 ± 0.01

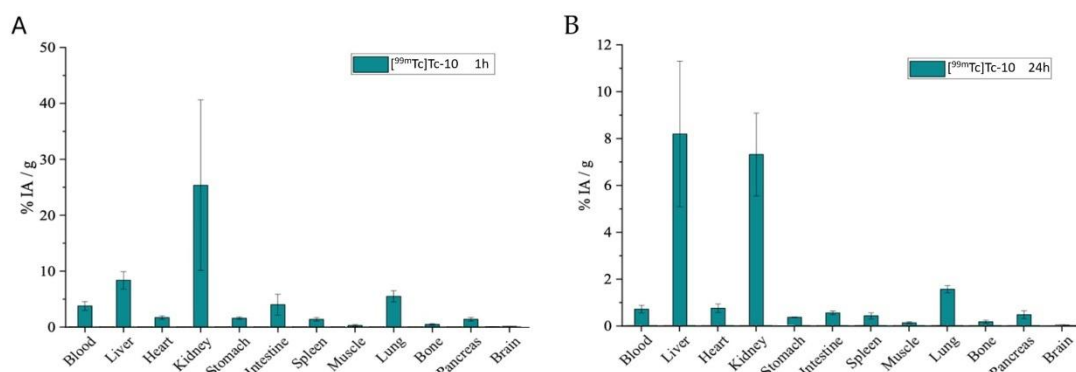
Πίνακας 14: Η αναλογία brain προς blood

Time	Brain/Blood ratio
5 min	0.049 ± 0.01
60 min	0.093 ± 0.05

3.5.2 Αποτελέσματα $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-10}$

Τα αποτελέσματα βιοκατανομής (Εικόνα 163 και Πίνακας 15) δείχνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των υπό εξέταση χρονικών σημείων (1 και 24 ώρες). Και στα δυο χρονικά σημεία βλέπουμε συσσώρευση στα νεφρά ενώ στις 24 ώρες υπάρχει μεγάλη συγκέντρωση και στο συκώτι. Αυτό θεωρούμε πως οφείλεται στην βιοκατανομή της ίδιας της

τεμοζολομίδης ¹²¹. Και στην ένωση 10 το ποσοστό πρόσληψης στον εγκέφαλο παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η αύξηση του λόγου εγκέφαλος/αίμα (Πίνακας 14) υποδηλώνει την αυξημένη συγκέντρωση στον εγκέφαλο με το πέρασμα του χρόνου. Η μείωση της συσσώρευσης στα άλλα όργανα καθώς και η αύξηση στον εγκέφαλο είναι ένας λόγος που πραγματοποιήθηκε η τροποποίηση της ένωσης **10** προς ένωση **14**.



Εικόνα 163: Εχ νίνο βιοκατανομή μετά από ενδοφλέβια χορήγηση της [^{99m}Tc]Tc-10. σε CFW ποντίκια, εκφρασμένη σε % IA/g (n = 3).

Πίνακας 15: Αποτελέσματα της εχ νίνο βιοκατανομής στη 1 και 24 ώρες μετά την χορήγηση (n = 3 ±SD).

Organ	1 h	24 h
Blood	3.78 ± 0.81	0.72 ± 0.16
Liver	8.37 ± 1.57	8.19 ± 3.11
Heart	1.70 ± 0.32	0.76 ± 0.19
Kidney	25.36 ± 15.26	7.32 ± 1.77
Stomach	1.59 ± 0.22	0.37 ± 0.01
Intestine	4.01 ± 1.87	0.56 ± 0.08
Spleen	1.39 ± 0.31	0.44 ± 0.13
Muscle	0.30 ± 0.15	0.13 ± 0.04
Lung	5.49 ± 1.00	1.57 ± 0.15
Bone	0.48 ± 0.14	0.18 ± 0.07
Pancreas	1.39 ± 0.33	0.48 ± 0.17
Brain	0.13 ± 0.02	0.04 ± 0.02

Πίνακας 16: Η αναλογία brain προς blood

Time	Brain/Blood ratio
1 h	0.034 ± 0.009
24 h	0.056 ± 0.03

IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκαν ο σχεδιασμός, σύνθεση και αξιολόγηση δύο διαφορετικών ραδιοθεραπευογνωστικών πλατφορμών για το γλοιώμα. Συγκεκριμένα, η πρώτη πλατφόρμα σχεδιάστηκε να διαθέτει τρία τμήματα: α) τον παράγοντα στόχευσης β) τον χηλικό παράγοντα DOTA και γ) συνδέτη που θα συνδέει τον παράγοντα στόχευσης και τον χηλικό υποκαταστάτη. Ως χηλικός υποκαταστάτης επιλέχθηκε ο 12μελή δακτύλιο τετρααζά που περιέχει τέσσερις καρβοξυλικές ομάδες που είναι ιδανικό για δέσμευση διαφορετικών ραδιομετάλλων για απεικόνιση του όγκου με MRI ή PET ή SPECT και θεραπεία με α- ή β- σωματίδια, ή ηλεκτρόνια Auger. Ως παράγοντας στόχευσης χρησιμοποιήθηκαν ανάλογα του 1,8-ναφθαλιμιδίου, το οποίο επιλέχθηκε α) για την ικανότητά του να φθορίζει και δράσει ως παράγοντας οπτική απεικόνιση και β) για την κυτταροτοξική δράση λόγω της ικανότητάς του να παρεμβάλλεται στις αζωτούχες βάσεις του DNA, εμποδίζοντας την αντιγραφή του, ενώ γ) παράλληλα, το 1,8-ναφθαλιμίδιο επιλέχθηκε για την δυνατότητα να τροποποιηθεί ο σκελετός του. Στο πλαίσιο αυτό συνθέσαμε τρία ανάλογα, το ανάλογο **7α** που φέρει στην 4-θέση υποκαταστάτη βρώμιο (με στόχο να υλοποιηθούν περαιτέρω τροποποιήσεις με αντιδράσεις (Sonogashira, Heck, Suzuki και πυρηνόφιλες αρωματικές προσθήκες), το ανάλογο **7β** που φέρει στη θέση 4- μορφολίνη για να στοχευθεί το μικροπεριβάλλον του καρκινικού κυττάρου και συγκεκριμένα τα λυσοσώματα. Επίσης, το ανάλογο **7γ** το οποίο φέρει στη θέση 4- την ομάδα διμεθυλάμινο ως εναλλακτική στόχευσης των λυσοσωμάτων. Για την πρώτη πλατφόρμα συντέθηκαν τρία διαφορετικά τελικά μόρια και οι ενδιάμεσες και τελικές ενώσεις καθαρίστηκαν με τεχνικές όπως η HPLC και η χρωματογραφία στήλης, και ταυτοποιήθηκαν με ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 2D-NMR καθώς και φασματομετρία μάζας.

Στην συνέχεια τα μόρια **7α**, **7β** και **7γ** μελετήθηκαν ως προς τις φωτοφυσικές τους ιδιότητες σε διάφορους διαλύτες (0.1M Sodium Acetate buffer pH 4.7, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και 1.4-διοξάνιο). Και οι τρεις ενώσεις έδειξαν ιδιαίτερα καλές φωτοφυσικές ιδιότητες και φάσματα εκπομπής που δύναται να αξιοποιηθούν σε πειράματα κυτταρικής απεικόνισης. Ακολούθησαν πειράματα σε διαφορετικά ποσοστά του δυαδικού συστήματος γλυκερόλης/νερού (από 10% έως 99% γλυκερόλη στους 25°C) με σκοπό την μελέτη ανταπόκρισής τους στο ιώδες προσομοιάζοντας τις υψηλές τιμές που βρίσκονται στο καρκινικό μικροπεριβάλλον. Η ένωση **7β** παρουσίασε 32.5 φορές μεγαλύτερη ένταση φθορισμού σε 99% γλυκερόλη σε σχέση με το 10% στα 551 nm και 28.5 φορές μεγαλύτερη στα 563 nm. Η ένωσης **7γ** στο 99% γλυκερόλη έχει 37.9 φορές μεγαλύτερη η ένταση σε σχέση με το 10% στα 547 nm και 34.7 φορές μεγαλύτερη στα 559 nm. Αντιθέτως, η ένωση **7α** δεν έδειξε αξιοσημείωτη μεταβολή στην ένταση φθορισμού. Η ένωση **7α** φθορίζει λόγω του φαινομένου ICT καθώς ηλεκτρονιακή πυκνότητα μεταφέρεται μέσω μιας π-γέφυρας σε έναν δέκτη. Αντίθετα οι ενώσεις **7β** και **7γ** ανταποκρίνονται στις μεταβολές του ιώδους και φθορίζουν μέσω του φαινομένου TICT. Έγινε επιπρόσθετη μελέτη στις ενώσεις **7β** και **7γ** σε διάφορες θερμοκρασίες όπου επιβεβαιώθηκε πως η αλλαγή στον φθορισμό οφείλεται στο ιώδες και όχι στην καλύτερη διαλυτότητα στην γλυκερόλη, ενώ και οι τρεις ενώσεις μελετήθηκαν σε τιμές pH 4.5, 6.2 και 7.4 όπου δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στην ένταση φθορισμού.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη της κυτταροτοξικής επίδρασης των αναλόγων του 1,8-ναφθαλιμιδίου σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος U87 και T98. Ιδιαίτερα σημαντικό υπήρξε το αποτέλεσμα πως και τα τρία ανάλογα του 1,8-ναφθαλιμιδίου

εμφάνισαν υψηλότερες τιμές κυτταροτοξικότητας συγκριτικά με την Τεμοζολομίδη στην ανθεκτική σειρά γλοιώματος T98 ενώ η **3a** εμφάνισε υψηλότερες τιμές και στην κυτταρική σειρά U87.

Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε επισημάνσεις των τριών διαφορετικών μορίων **7a**, **7b** και **7γ** με ψυχρά μέταλλα (^{157}Gd , ^{144}Nd , ^{152}Eu , ^{159}Tb) όπου οι αποδόσεις ήταν >99% αλλά και με ραδιομέταλλα (^{68}Ga , ^{161}Tb , ^{177}Lu) με αποδόσεις >90%, δείχνοντας την αποτελεσματικότητα επισημάνσης τους. Τα πλέον ραδιοθεραπογνωστικά [^{68}Ga]-**7a**, [^{68}Ga]-**7b**, [^{68}Ga]-**7γ**, [^{161}Tb]-**7a**, [^{177}Lu]-**7a** έδειξαν υψηλή *in vitro* σταθερότητα σε θερμοκρασία δωματίου και σε ανθρώπινο ορό. Η ραδιοεπισημασμένη ένωση [^{161}Tb]-**7a** επιλέχθηκε για πειράματα *in vivo* βιοκατανομής σε ποντίκια CFW (Carworth Farms Webster). Ιδιαίτερα σημαντικό είναι πως η [^{161}Tb]-**7a** εντοπίστηκε στα 5 λεπτά στον εγκέφαλο επιβεβαιώνοντας το σχεδιασμό μας να δύναται να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Τα πειράματα βιοκατανομής επαναλήφθηκαν για 1 ώρα και καταγράφηκε πως το ποσοστό πρόσληψης της ουσίας στον εγκέφαλο διατηρείται σε παρόμοια σχετικά επίπεδα στους δύο χρόνους ενώ παράλληλα τα ποσοστά στο αίμα μειώνονται σημαντικά στην μια ώρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του λόγου εγκέφαλος/αίμα, σημαντικό γεγονός καθώς υποδηλώνεται η ικανότητα της ένωσης να χρησιμοποιηθεί εν δυνάμει ραδιοθεραπογνωστικό μόριο.

Η δεύτερη ραδιοθεραπογνωστική πλατφόρμα σχεδιάστηκε βασισμένη στα κύρια χαρακτηριστικά του $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tetrofosmin, για απεικόνιση με SPECT μέσω του ραδιοϊσοτόπου $^{99\text{m}}\text{Tc}$ και ταυτόχρονη στόχευση μιτοχονδρίων (οργανίδια που όπως και τα λυσοσώματα, υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα, και είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας) λόγω του θετικού φορτίου του συμπλόκου και του αρνητικού δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Συγκεκριμένα, σχεδιάσαμε δύο διαφορετικά μόρια τα **10** και **14**. Το μόριο **10** φέρει υποκαταστάτη δέσμησης $^{99\text{m}}\text{Tc}$, έναν αλειφατικό σύνδεσμο και εκεί έχουμε προσδέσει την Τεμοζολομίδη, βασικό αντικαρκινικό φάρμακο με χρήση στην χημειοθεραπεία κατά του γλοιώματος. Στόχος είναι να μπορούμε να έχουμε στην ίδια πλατφόρμα τον κυτταροτοξικό παράγοντα και έναν παράγοντα απεικόνισης που θα υποβοηθήσει στην μελέτη της βιοκατανομής και απόκρισης στην θεραπεία. Το μόριο **14** σχεδιάστηκε ως ένα καινοτόμο τροποποιημένο αμινοξύ (διαθέτει α-αμινομάδα και καρβοξυλομάδα) το οποίο φέρει στην παράπλευρη αλυσίδα ομάδα δέσμησης του $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Στόχος ήταν το μόριο αυτό να μπορεί να εισαχθεί σε πεπτιδικές αλληλουχίες (όπως πεπτίδια φορείς) και να δράσει ως απεικονιστικός παράγοντας και επίσης, να μπορεί να αξιοποιηθούν οι λειτουργικές ομάδες (αμινομάδα, καρβοξυλομάδα) ως θέσεις πρόσδεσης κυτταροτοξικών μορίων. Στο πλαίσιο αυτό στο μόριο **14** προσαρτήθηκε στην α-αμινομάδα η Τεμοζολομίδη. Οι ενδιάμεσες και τελικές ενώσεις καθαρίστηκαν με τεχνικές όπως η HPLC και η χρωματογραφία στήλης, και ταυτοποιήθηκαν με $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, 2D-NMR καθώς και φασματομετρία μάζας.

Η ένωση **10** μελετήθηκε ως προς την κυτταροτοξικότητά της σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος U87, T98 αλλά και ως προς την τοξικότητά της σε φυσιολογικούς οργανισμούς σε πειραματικά μοντέλα zebrafish. Τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα σημαντικά καθώς στην σειρά U87 η κυτταροτοξικότητα είναι 1.7 φορές μεγαλύτερη της TMZ ενώ στην ανθεκτική T98, 5.3 φορές μεγαλύτερη. Από τα πειράματα *in vivo* τοξικότητας, τα ποσοστά θνησιμότητας αυξάνονται σε συγκεντρώσεις πολύ υψηλότερες από τις τιμές IC_{50} στις κυτταρικές σειρές γλοιώματος, υποδηλώνοντας ένα ευνοϊκό θεραπευτικό παράθυρο για κλινική αξιολόγηση.

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε ραδιοεπισήμανση με ^{99m}Tc με >95% απόδοση. Η ραδιοεπισημασμένη ένωση ^{99m}Tc -10 έδειξε μεγάλη σταθερότητα σε θερμοκρασία δωματίου και σε ανθρώπινο ορό και έτσι προχώρησε σε πειράματα βιοκατανομής σε CFW ποντίκια. Η συγκέντρωση της στον εγκέφαλο ήταν εξίσου ενθαρρυντική.

Συγκεντρωτικά, σχεδιάστηκαν και αναπτύχθηκαν τρία διαφορετικά μόρια (**7α**, **7β**, **7γ**) για την πρώτη πλατφόρμα τα οποία οδήγησαν στα ακόλουθα ραδιοεπισημασμένα μόρια ^{68}Ga -7α, ^{68}Ga -7β, ^{68}Ga -7γ, ^{161}Tb -7α, ^{177}Lu -7α. Το πλήθος των μορίων ελέγχθηκε για την βιολογική δράση. Το μόριο ^{161}Tb -7α φάνηκε να ικανοποιεί το σχεδιασμό καθώς παρουσίασε σημαντικό κυτταροτοξικό προφίλ και προφίλ βιοκατανομής στον εγκέφαλο αποτελώντας μια πλατφόρμα που αξίζει να προχωρήσει σε περαιτέρω *in vivo* μελέτες. Για την δεύτερη πλατφόρμα, αναπτύχθηκαν τα μόρια **10** και **14** τα οποία επίσης παρουσίασαν ιδιαίτερα σημαντικό κυτταροτοξικό προφίλ σε σχέση με τον υφιστάμενο χημειοθεραπευτικό παράγοντα για το γλοίωμα και παράλληλα η ένωση ^{99m}Tc -10 παρουσίασε ιδιαίτερα ελπιδοφόρα αποτελέσματα για την ικανότητα να εισέρχεται στον εγκέφαλο, επίσης αποτελώντας μια ένωση που χρήζει περαιτέρω *in vivo* διερεύνησης για την ανάπτυξή του ως αποτελεσματικό ραδιοθεραπογνοστικό.

V. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Table 17. Viscosity of Aqueous Glycerol Solutions Centipoises											
Glyc. % Wt.	Temperature (°C)										
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
0*	1.792	1.308	1.005	0.8007	0.6560	0.5494	0.4688	0.4061	0.3565	0.3165	0.2838
10	2.44	1.74	1.31	1.03	0.828	0.680	0.575	0.500	—	—	—
20	3.44	2.41	1.76	1.35	1.07	0.879	0.731	0.635	—	—	—
30	5.14	3.49	2.50	1.87	1.46	1.16	0.956	0.816	0.690	—	—
40	8.25	5.37	3.72	2.72	2.07	1.62	1.30	1.09	0.918	0.763	0.668
50	14.6	9.01	6.00	4.21	3.10	2.37	1.86	1.53	1.25	1.05	0.910
60	29.9	17.4	10.8	7.19	5.08	3.76	2.85	2.29	1.84	1.52	1.28
65	45.7	25.3	15.2	9.85	6.80	4.89	3.66	2.91	2.28	1.86	1.55
67	55.5	29.9	17.7	11.3	7.73	5.50	4.09	3.23	2.50	2.03	1.68
70	76	38.8	22.5	14.1	9.40	6.61	4.86	3.78	2.90	2.34	1.93
75	132	65.2	35.5	21.2	13.6	9.25	6.61	5.01	3.80	3.00	2.43
80	255	116	60.1	33.9	20.8	13.6	9.42	6.94	5.13	4.03	3.18
85	540	223	109	58	33.5	21.2	14.2	10.0	7.28	5.52	4.24
90	1310	498	219	109	60.0	35.5	22.5	15.5	11.0	7.93	6.00
91	1590	592	259	127	68.1	39.8	25.1	17.1	11.9	8.62	6.40
92	1950	729	310	147	78.3	44.8	28.0	19.0	13.1	9.46	6.82
93	2400	860	367	172	89	51.5	31.6	21.2	14.4	10.3	7.54
94	2930	1040	437	202	105	58.4	35.4	23.6	15.8	11.2	8.19
95	3690	1270	523	237	121	67.0	39.9	26.4	17.5	12.4	9.08
96	4600	1580	624	281	142	77.8	45.4	29.7	19.6	13.6	10.1
97	5770	1950	765	340	166	88.9	51.9	33.6	21.9	15.1	10.9
98	7370	2460	939	409	196	104	59.8	38.5	24.8	17.0	12.2
99	9420	3090	1150	500	235	122	69.1	43.6	27.8	19.0	13.3
100	12070	3900	1410	612	284	142	81.3	50.6	31.9	21.3	14.8

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

Εικόνα 164: Τιμές ιξώδους των δυαδικών συστημάτων γλυκερόλης/νερού σε centipoise, στις διάφορες θερμοκρασίες ¹¹⁶.

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. National Cancer Institute - <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
3. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* **12**, 31–46 (2022).
4. Liu, J. *et al.* Barrier permeation and improved nanomedicine delivery in tumor microenvironments. *Cancer Lett* **562**, 216166 (2023).
5. Wang, Y. *et al.* The safety and efficacy of lenvatinib combined with immune checkpoint inhibitors therapy for advanced hepatocellular carcinoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **132**, 110797 (2020).
6. Piñeiro Fernández, J., Luddy, K. A., Harmon, C. & O’Farrelly, C. Hepatic Tumor Microenvironments and Effects on NK Cell Phenotype and Function. *Int J Mol Sci* **20**, 4131 (2019).
7. Yeom, C., Goto, Y., Zhu, Y., Hiraoka, M. & Harada, H. Microenvironments and Cellular Characteristics in the Micro Tumor Cords of Malignant Solid Tumors. *Int J Mol Sci* **13**, 13949–13965 (2012).
8. Shi, Z., Li, Q. & Mei, L. pH-Sensitive nanoscale materials as robust drug delivery systems for cancer therapy. *Chinese Chemical Letters* **31**, 1345–1356 (2020).
9. Boedtker, E. & Pedersen, S. F. The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. *Annu Rev Physiol* **82**, 103–126 (2020).
10. Bera, K. *et al.* Extracellular fluid viscosity enhances cell migration and cancer dissemination. *Nature* **611**, 365–373 (2022).
11. Yin, J., Kong, X. & Lin, W. Noninvasive Cancer Diagnosis *In Vivo* Based on a Viscosity-Activated Near-Infrared Fluorescent Probe. *Anal Chem* **93**, 2072–2081 (2021).
12. Yeom, C., Goto, Y., Zhu, Y., Hiraoka, M. & Harada, H. Microenvironments and Cellular Characteristics in the Micro Tumor Cords of Malignant Solid Tumors. *Int J Mol Sci* **13**, 13949–13965 (2012).
13. National Cancer Institute - <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging>.
14. American Joint Committee on Cancer - <https://www.facs.org/quality-programs/cancer-programs/american-joint-committee-on-cancer/cancer-staging-systems/>.
15. Union for International Cancer Control - <https://www.uicc.org/what-we-do/sharing-knowledge/tnm>.
16. Παγκόσμιο Παρατηρητήριο Καρκίνου - <https://gco.iarc.fr/today/en>.
17. National Cancer Institute - <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis>.
18. Radiopaedia - <https://radiopaedia.org/articles/single-photon-emission-computed-tomography-spect>.
19. Crouch Stanley, Holler James, Skoog Douglas & West Donald. *Θεμελιώδεις Αρχές Αναλυτικής Χημείας*. vol. 2020 (ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΩΣΤΑΡΑΚΗ ΕΥΡΥΔΙΚΗ).
20. Edinburgh Instruments - <https://www.edinst.com/resource/what-is-a-jablonski-diagram-perrin-jablonski-diagram/>.
21. Chroma - <https://www.chroma.com/support/knowledge-center/about-fluorescence/fluorochrome-spectra>.

22. Zheng, M. *et al.* Determining the Energy Gap between the S_1 and T_1 States of Thermally Activated Delayed Fluorescence Molecular Systems Using Transient Fluorescence Spectroscopy. *J Phys Chem Lett* **13**, 2507–2515 (2022).
23. Fu, Y. & Finney, N. S. Small-molecule fluorescent probes and their design. *RSC Adv* **8**, 29051–29061 (2018).
24. Edinburgh Instruments - <https://www.edinst.com/resource/what-is-forster-resonance-energy-transfer-fret/>.
25. Mikhnenko, O. V., Blom, P. W. M. & Nguyen, T.-Q. Exciton diffusion in organic semiconductors. *Energy Environ Sci* **8**, 1867–1888 (2015).
26. National Cancer Institute - <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>.
27. Liu, G., Chen, T., Zhang, X., Ma, X. & Shi, H. Small molecule inhibitors targeting the cancers. *MedComm (Beijing)* **3**, (2022).
28. Han-Chung, W., Chang, D.-K. & Chia-Ting, H. Targeted Therapy for Cancer. *Journal of Cancer Molecules* **2**, (2006).
29. Kapoor, D., Bhatt, S., Kumar, M., Maheshwari, R. & Tekade, R. K. Ligands for Targeted Drug Delivery and Applications. in *Basic Fundamentals of Drug Delivery* 307–342 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-817909-3.00008-X.
30. Ding, Q. *et al.* Subcellular targeting strategies: Chemical structure-based design concepts for bioimaging and theranostics. *Cell Biomaterials* **1**, 100001 (2025).
31. Lin, J., Yang, K. & New, E. J. Strategies for organelle targeting of fluorescent probes. *Org Biomol Chem* **19**, 9339–9357 (2021).
32. Wang, H. *et al.* Recent Advances in Chemical Biology of Mitochondria Targeting. *Front Chem* **9**, (2021).
33. Goshisht, M. K., Tripathi, N., Patra, G. K. & Chaskar, M. Organelle-targeting ratiometric fluorescent probes: design principles, detection mechanisms, bio-applications, and challenges. *Chem Sci* **14**, 5842–5871 (2023).
34. Axis Pharm - <https://axispharm.com/cleavable-linkers-play-a-pivotal-role-in-the-success-of-adcs/>.
35. Corrie, P. G. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine* **36**, 24–28 (2008).
36. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Ν. ΔΕΜΕΤΖΟΣ. *Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία Βασικές Αρχές Και Πρακτικές Εφαρμογές*. (ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε, 2014).
37. Τι είναι ραδιοφάρμακα - <https://www.beconscious.gr/q-a/326-ti-einai-ta-radiofarmaka>.
38. Hamoudeh, M., Kamleh, M. A., Diab, R. & Fessi, H. Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. *Adv Drug Deliv Rev* **60**, 1329–1346 (2008).
39. Qaim, S. M. Therapeutic radionuclides and nuclear data. *Radiochim Acta* **89**, 297–304 (2001).
40. Weller, M. *et al.* Targeted radionuclide therapy for gliomas: Emerging clinical trial landscape. *Neuro Oncol* **26**, S208–S214 (2024).
41. Zhang, S. *et al.* Radiopharmaceuticals and their applications in medicine. *Signal Transduct Target Ther* **10**, 1 (2025).
42. Jadvar, H., Chen, X., Cai, W. & Mahmood, U. Radiotheranostics in Cancer Diagnosis and Management. *Radiology* **286**, 388–400 (2018).
43. Zhang, S. *et al.* Radiopharmaceuticals and their applications in medicine. *Signal Transduct Target Ther* **10**, 1 (2025).
44. Nesmerak, K. Lanthanide/Actinide in Health and Disease. in *Encyclopedia of Metalloproteins* 1091–1098 (Springer New York, New York, NY, 2013). doi:10.1007/978-1-4614-1533-6_152.

45. Lyra, M. E. *et al.* Radionuclides Used in Nuclear Medicine Therapy – From Production to Dosimetry. *Curr Med Imaging Rev* **9**, 51–75 (2013).
46. Varghese, T. P., John, A. & Mathew, J. Revolutionizing cancer treatment: The role of radiopharmaceuticals in modern cancer therapy. *Precis Radiat Oncol* **8**, 145–152 (2024).
47. Reddy, M. L. P. & Bejoymohandas, K. S. Luminescent lanthanide-based molecular materials: applications in photodynamic therapy. *Dalton Transactions* **53**, 1898–1914 (2024).
48. Ibrahim, M. A., Hazhirkarzar, B. & Dublin, A. B. *Gadolinium Magnetic Resonance Imaging*. (2025).
49. Khorasani-Motlagh, M., Noroozifar, M. & Mirkazehi-Rigi, S. Fluorescence and DNA-binding spectral studies of neodymium(III) complex containing 2,2'-bipyridine, [Nd(bpy)₂Cl₃·OH₂]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **75**, 598–603 (2010).
50. Liu, Q. *et al.* Neodymium ternary complexes with 2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine: Synthesis, crystal structure and fluorescence property. *J Mol Struct* **1193**, 151–157 (2019).
51. Lengacher, R. *et al.* Targeted, Molecular Europium (^{III}) Probes Enable Luminescence-Guided Surgery and 1 Photon Post-Surgical Luminescence Microscopy of Solid Tumors. *J Am Chem Soc* **145**, 24358–24366 (2023).
52. Van Laere, C. *et al.* Terbium radionuclides for theranostic applications in nuclear medicine: from atom to bedside. *Theranostics* **14**, 1720–1743 (2024).
53. Müller, C. *et al.* Terbium-161 for PSMA-targeted radionuclide therapy of prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **46**, 1919–1930 (2019).
54. Dash, A., Pillai, M. R. A. & Knapp, F. F. Production of ¹⁷⁷Lu for Targeted Radionuclide Therapy: Available Options. *Nucl Med Mol Imaging* **49**, 85–107 (2015).
55. Pillai, A. & (Russ) Knapp, F. Evolving Important Role of Lutetium-177 for Therapeutic Nuclear Medicine. *Curr Radiopharm* **8**, 78–85 (2015).
56. Velikyan, I. Prospective of ⁶⁸Ga-Radiopharmaceutical Development. *Theranostics* **4**, 47–80 (2014).
57. von Eyben, F. E., Picchio, M., von Eyben, R., Rhee, H. & Bauman, G. ⁶⁸Ga-Labeled Prostate-specific Membrane Antigen Ligand Positron Emission Tomography/Computed Tomography for Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol Focus* **4**, 686–693 (2018).
58. R. Dilworth, J. & J. Parrott, S. The biomedical chemistry of technetium and rhenium. *Chem Soc Rev* **27**, 43 (1998).
59. Riondato, M. *et al.* Oldie but Goodie: Is Technetium-99m Still a Treasure Trove of Innovation for Medicine? A Patents Analysis (2000–2022). *J Med Chem* **66**, 4532–4547 (2023).
60. Ku, A., Facca, V. J., Cai, Z. & Reilly, R. M. Auger electrons for cancer therapy – a review. *EJNMMI Radiopharm Chem* **4**, 27 (2019).
61. Aghevlian, S., Boyle, A. J. & Reilly, R. M. Radioimmunotherapy of cancer with high linear energy transfer (LET) radiation delivered by radionuclides emitting α -particles or Auger electrons. *Adv Drug Deliv Rev* **109**, 102–118 (2017).
62. ARPA NSA - <https://www.arpansa.gov.au/understanding-radiation/what-is-radiation/ionising-radiation/beta-particles>.
63. National Cancer Institute - <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/glioma>.

64. Choate, K. A., Pratt, E. P. S., Jennings, M. J., Winn, R. J. & Mann, P. B. IDH Mutations in Glioma: Molecular, Cellular, Diagnostic, and Clinical Implications. *Biology (Basel)* **13**, 885 (2024).
65. Śledzińska, P., Bebyn, M. G., Furtak, J., Kowalewski, J. & Lewandowska, M. A. Prognostic and Predictive Biomarkers in Gliomas. *Int J Mol Sci* **22**, 10373 (2021).
66. Louis, D. N. *et al.* The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol* **23**, 1231–1251 (2021).
67. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *New England Journal of Medicine* **372**, 2481–2498 (2015).
68. Noor, H., Briggs, N. E., McDonald, K. L., Holst, J. & Vittorio, O. TP53 Mutation Is a Prognostic Factor in Lower Grade Glioma and May Influence Chemotherapy Efficacy. *Cancers (Basel)* **13**, 5362 (2021).
69. World Health Organization - Cancer Today - <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/31-brain-central-nervous-system-fact-sheet.pdf>.
70. Bleeker, F. E., Molenaar, R. J. & Leenstra, S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *J Neurooncol* **108**, 11–27 (2012).
71. Angom, R. S., Nakka, N. M. R. & Bhattacharya, S. Advances in Glioblastoma Therapy: An Update on Current Approaches. *Brain Sci* **13**, 1536 (2023).
72. Νευροχειρουργική Κλινική ΓΝΑ Γ. Γεννηματάς - <https://www.neurosurgerygennimatas.gr/Diseases/Gloiomata/>.
73. Lerner, A. *et al.* Gliomas in adults: Guidance on investigations, diagnosis, treatment and surveillance. *Clinical Medicine* **24**, 100240 (2024).
74. Cleveland Clinic - <https://my.clevelandclinic.org/health/diagnostics/25090-immunohistochemistry>.
75. Cordier, D., Krolicki, L., Morgenstern, A. & Merlo, A. Targeted Radiolabeled Compounds in Glioma Therapy. *Semin Nucl Med* **46**, 243–249 (2016).
76. European Medicines Agency - <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/temodal>.
77. Newton, H. B. Clinical Pharmacology of Brain Tumor Chemotherapy. in *Handbook of Brain Tumor Chemotherapy* 21–43 (Elsevier, 2006). doi:10.1016/B978-012088410-0/50040-8.
78. Flora, G., Mittal, M. & Flora, S. J. S. Medical Countermeasures—Chelation Therapy. in *Handbook of Arsenic Toxicology* 589–626 (Elsevier, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-418688-0.00026-5.
79. Nowack, B. Chelating agents and the environment. *Environmental Pollution* **153**, 1–2 (2008).
80. Pinto, I. S. S., Neto, I. F. F. & Soares, H. M. V. M. Biodegradable chelating agents for industrial, domestic, and agricultural applications—a review. *Environmental Science and Pollution Research* **21**, 11893–11906 (2014).
81. Leštan, D., Luo, C. & Li, X. The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soils: A review. *Environmental Pollution* **153**, 3–13 (2008).
82. Sun, X. & Anderson, C. J. Production and Applications of Copper-64 Radiopharmaceuticals. in 237–261 (2004). doi:10.1016/S0076-6879(04)86011-7.
83. Sarko, D., Eisenhut, M., Haberkorn, U. & Mier, W. Bifunctional Chelators in the Design and Application of Radiopharmaceuticals for Oncological Diseases. *Curr Med Chem* **19**, 2667–2688 (2012).

84. Thanh, P. M., Ketheesan, B., Yan, Z. & Stuckey, D. Trace metal speciation and bioavailability in anaerobic digestion: A review. *Biotechnol Adv* **34**, 122–136 (2016).
85. Li, M. *et al.* Advances in macrocyclic chelators for positron emission tomography imaging. *VIEW* **4**, (2023).
86. Brechbiel, M. W. Bifunctional chelates for metal nuclides. *The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR), [and] Section of the Society of...* **52**, 166–73 (2008).
87. Sneddon, D. & Cornelissen, B. Emerging chelators for nuclear imaging. *Curr Opin Chem Biol* **63**, 152–162 (2021).
88. Brennecke, B. *et al.* DOTAM-Based, Targeted, Activatable Fluorescent Probes for the Highly Sensitive and Selective Detection of Cancer Cells. *Bioconjug Chem* **32**, 702–712 (2021).
89. Sudo, H. *et al.* Head-to-head comparison of three chelates reveals DOTAGA promising for ²²⁵Ac labeling of anti-FZD10 antibody OTSA101. *Cancer Sci* **114**, 4677–4690 (2023).
90. Nelson, B. J. B., Andersson, J. D. & Wuest, F. Radiolanthanum: Promising theranostic radionuclides for PET, alpha, and Auger-Meitner therapy. *Nucl Med Biol* **110–111**, 59–66 (2022).
91. Griesbaum, K. *et al.* Hydrocarbons. in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (Wiley, 2000). doi:10.1002/14356007.a13_227.
92. Anastasova, D. *et al.* A Gram Scale Synthesis of 3,4-Dihalogen Substituted 1,8-Naphthalimides. *Molbank* **2024**, M1918 (2024).
93. Xu, Z. *et al.* The Synthesis and Antitumor Activity of 1,8-Naphthalimide Derivatives Linked 1,2,3-Triazole. *Front Bioeng Biotechnol* **9**, (2021).
94. Ruan, W. *et al.* An Overview of Naphthylimide as Specific Scaffold for New Drug Discovery. *Molecules* **29**, 4529 (2024).
95. KLEIN DAVID. *ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ (ΔΕΥΤΕΡΟΣ ΤΟΜΟΣ)*. (UTOPIA, 2015).
96. Laszlo Kurti & Barbara Czako. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*. (2005).
97. Ali, Md. A., Moromi, S. K., Touchy, A. S. & Shimizu, K. Direct Synthesis of Cyclic Imides from Carboxylic Anhydrides and Amines by Nb₂O₅ as a Water-Tolerant Lewis Acid Catalyst. *ChemCatChem* **8**, 891–894 (2016).
98. Yang, J., Griffin, A., Qiang, Z. & Ren, J. Organelle-targeted therapies: a comprehensive review on system design for enabling precision oncology. *Signal Transduct Target Ther* **7**, 379 (2022).
99. Alexiou, G. A. *et al.* Evaluation of glioma proliferation by ^{99m}Tc-Tetrofosmin. *Neuro Oncol* **10**, 104–105 (2008).
100. Murphy, M. P. Targeting lipophilic cations to mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1777**, 1028–1031 (2008).
101. Liang, M. *et al.* Enhanced blood–brain barrier penetration and glioma therapy mediated by T7 peptide-modified low-density lipoprotein particles. *Drug Deliv* **25**, 1652–1663 (2018).
102. Cai, X. *et al.* Angiopep-2-Functionalized Lipid Cubosomes for Blood–Brain Barrier Crossing and Glioblastoma Treatment. *ACS Appl Mater Interfaces* **16**, 12161–12174 (2024).
103. Smith, R. A. J., Hartley, R. C., Cochemé, H. M. & Murphy, M. P. Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **33**, 341–352 (2012).

104. Li, L. *et al.* An Activatable ^{19}F MRI Molecular Probe for Sensing and Imaging of Norepinephrine. *ChemistryOpen* **11**, (2022).
105. Hingorani, D. V., Randtke, E. A. & Pagel, M. D. A CatalyCEST MRI Contrast Agent That Detects the Enzyme-Catalyzed Creation of a Covalent Bond. *J Am Chem Soc* **135**, 6396–6398 (2013).
106. Kohl, S. W. *et al.* New Synthetic Routes for 1-Benzyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane and 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1-acetic Acid Ethyl Ester, Important Starting Materials for Metal-coded DOTA-Based Affinity Tags. *Zeitschrift für Naturforschung B* **62**, 397–406 (2007).
107. Liu, P., Wang, L., Chen, L., Su, X. & Shi, X. Cyclotriphosphazene-Based “Butterfly” Fluorescence Probe for Lysosome Targeting. *Bioconjug Chem* **32**, 1117–1122 (2021).
108. Al-Aqar, R. *et al.* Exciton Migration and Surface Trapping for a Photonic Crystal Displaying Charge-Recombination Fluorescence. *Chemistry – A European Journal* **22**, 15420–15429 (2016).
109. Shen, S. *et al.* Synthesis, Optimization, and Evaluation of Glycosylated Naphthalimide Derivatives as Efficient and Selective Insect β -N-Acetylhexosaminidase OfHex1 Inhibitors. *J Agric Food Chem* **67**, 6387–6396 (2019).
110. O'Malley, W. *et al.* Cellular Uptake and Photo-Cytotoxicity of a Gadolinium(III)-DOTA-Naphthalimide Complex “Clicked” to a Lipidated Tat Peptide. *Molecules* **21**, 194 (2016).
111. Zhang, H., Zhang, M., Zheng, Y.-C., Zhang, J.-G. & Xu, H. The design, synthesis and cellular imaging of a tumor-anchored, potent and cell-permeable BRD4-targeted fluorescent ligands. *Bioorg Chem* **114**, 105120 (2021).
112. Shen, S. *et al.* Modification of the Thioglycosyl–Naphthalimides as Potent and Selective Human O-GlcNAcase Inhibitors. *ACS Med Chem Lett* **9**, 1241–1246 (2018).
113. Kasten, B. B. *et al.* Isothiocyanate-Functionalized Bifunctional Chelates and *fac* -[M^I(CO)₃]⁺ (M = Re, $^{99\text{m}}$ Tc) Complexes for Targeting uPAR in Prostate Cancer. *Bioconjug Chem* **27**, 130–142 (2016).
114. Vilà, S., Badosa, E., Montesinos, E., Feliu, L. & Planas, M. Solid-Phase Synthesis of Peptide Conjugates Derived from the Antimicrobial Cyclic Dcapeptide BPC194. *European J Org Chem* **2015**, 1117–1129 (2015).
115. Bera, K. *et al.* Extracellular fluid viscosity enhances cell migration and cancer dissemination. *Nature* **611**, 365–373 (2022).
116. Association, G.P., Physical Properties of Glycerine and Its Solutions. 1963: Glycerine Producers' Association. .
117. Walsh, J. J. *et al.* Imaging Hallmarks of the Tumor Microenvironment in Glioblastoma Progression. *Front Oncol* **11**, (2021).
118. Zeng, J., Shirihai, O. S. & Grinstaff, M. W. Modulating lysosomal pH: a molecular and nanoscale materials design perspective. *JoLS, Journal of Life Sciences* (2020) doi:10.36069/JoLS/20201204.
119. Junior, N. Citrate-Phosphate Buffer v1. Preprint at <https://doi.org/10.17504/protocols.io.bfydjps6> (2020).
120. Hu, Y., Jiao, B., Wang, C. & Wu, J. Regulation of temozolomide resistance in glioma cells via the RIP2/NF- κ B/MGMT pathway. *CNS Neurosci Ther* **27**, 552–563 (2021).
121. Krajcer, A., Grzywna, E. & Lewandowska-Łańcucka, J. Strategies increasing the effectiveness of temozolomide at various levels of anti-GBL therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **165**, 115174 (2023).