

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»

«ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σύνθεση ακυλιωμένων παραγώγων του 3-αμινοφθαλυδραζιδίου ως ενώσεις με πιθανές βιολογικές εφαρμογές

Δασκαλάκη Δέσποινα-Ήρα

AOHNA

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2017



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ» ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σύνθεση ακυλιωμένων παραγώγων του 3-αμινοφθαλυδραζιδίου ως ενώσεις με πιθανές βιολογικές εφαρμογές

Δασκαλάκη Δέσποινα-Ήρα

ΑΘΗΝΑ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2017

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σύνθεση ακυλιωμένων παραγώγων του 3-αμινοφθαλυδραζιδίου ως ενώσεις με πιθανές βιολογικές εφαρμογές

Δασκαλάκη Δέσποινα-Ήρα

AM.: 141512

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Γεώργιος Χ. Βουγιουκαλάκης, Επίκουρος Καθηγητής

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γεώργιος Χ. Βουγιουκαλάκης, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

Δημήτριος Γεωργιάδης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Σταματία Βασιλείου, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2017

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ετεροκυκλικές ενώσεις του αζώτου έχουν μελετηθεί εκτενώς λόγω των ποικίλων εφαρμογών τους σε διάφορους τομείς, με σημαντικότερους αυτούς της βιολογίας και της ιατρικής. Ειδικότερα, μεγάλος αριθμός ερευνητικών εργασιών έχει αξιολογήσει τη βιολογική δράση των οξυγονούχων παραγώγων των φθαλαζινών, των φθαλαζινονών και φθαλυδραζιδίων, οποία тα χρησιμοποιούνται πια ευρέως ως θεραπευτικοί παράγοντες λόγω της πολλαπλής δράσης τους ως αντιιικά, αναλγητικά, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινικά φάρμακα. Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των φθαλυδραζιδίων είναι η χημειοφωταύγεια που εμφανίζουν κάτω από κατάλληλες συνθήκες οξείδωσής τους. Τα παράγωγα των κυκλικών αυτών υδραζιδίων έχουν χρησιμοποιηθεί σε αναλυτικές και βιοχημικές εφαρμογές, αλλά και σε άλλους αναπτυσσόμενους κλάδους, όπως η φωτοδυναμική και η στοχευμένη θεραπεία. Ο συνδυασμός αυτών με άλλες λειτουργικές ομάδες, μέσω αντιδράσεων ακυλίωσης, αλκυλίωσης και αρωματικής υποκατάστασης, αποτελεί πραγματική πρόκληση, δεδομένου ότι μπορεί να οδηγήσει στην σύνθεση νέων ενώσεων με μοναδικό φυσικοχημικό και βιολογικό χαρακτήρα.

Στην παρούσα ερευνητική διατριβή συντέθηκαν παράγωγα της οικογένειας των φθαλαζινών με πιθανή βιολογική δράση. Αναπτύχθηκε κατάλληλη μεθοδολογία για την παρασκευή τους και όλα τα ενδιάμεσα και τελικά προϊόντα ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR ¹Η και ¹³C) και φασματομετρία μάζας. Η σύνθεση των παραγώγων επικεντρώθηκε στις αντιδράσεις ακυλίωσης και θειοακυλίωσης της άμινο ομάδας ενός φθαλαζινοπαραγώγου και του πρόδρομου μορίου του, ενός φθαλιμιδίου, από λιπόφιλα ιόντα, όπως τα τριφαινυλοφώσφινο κατιοντικά παράγωγα, με σκοπό την διερεύνηση της χημειοφωταύγειας και της πιθανής βιολογικής φωτοχημικής τους δράσης.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Οργανική Σύνθεση

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Φθαλαζίνες, φθαλυδραζίδια, βιολογική δράση, χημειοφωταύγεια.

ABTRACT

Heterocyclic nitrogen compounds have been studied extensively due to their numerous applications in various sectors with more important those of biology and medicine. In particular, a large number of research works have synthesized and evaluated the biological activity of oxygenated derivatives of phthalazine, phthalazine and phthalhydrazide, which are now widely used as therapeutic agents, due to their multiple action as antiviral, analgesic, anti-inflammatory and anti-cancer important feature drugs. An of phthalhydrazide is its chemiluminescent emission under speficic oxidative conditions. Derivatives of these cyclic hydrazides have been used in analytical and biochemical applications, but also in promissing sectors such as photodynamic and targeted therapy. The combination of these compounds with other functional groups, by acylation, alkylation and aromatic substitution, is a real challenge, as it can lead to the synthesis of novel compounds with unique physicochemical and biological nature. In the present thesis, derivatives of phthalazine with possible biological activity have been synthesized. An appropriate methodology for preparing them has been developed, while all intermediates and final products were characterized by nuclear magnetic resonance (¹H and ¹³C NMR) and mass spectrometry. The synthesis of these derivatives focuses on acylation and thioacylation reactions of the amino group of a phthalazine derivative and the precursor molecule. а phthalimide, with lipophilic ions. such as triphenylphosphine cationic derivatives. investigate in order their to chemiluminescent and possible photobiological action.

SUBJECT AREA: Organic Synthesis

KEYWORDS: Phthalhydrazide, acylation, biological activity, chemiluminescence.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά την περίοδο Νοέμβριος 2014 - Σεπτέμβριος 2016, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Γεώργιου Χ. Βουγιουκαλάκη.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Γεώργιο Χ. Βουγιουκαλάκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για τη συνεχή βοήθεια και καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο, και κυρίως για την άψογη συνεργασία που είχαμε. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Δημήτριο Γεωργιάδη και την Επίκουρη Καθηγήτρια Σταματία Βασιλείου για τις υποδείξεις και παρατηρήσεις τους με σκοπό την ολοκλήρωση και βελτιστοποίηση της παρούσας εργασίας. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στα μέλη της ερευνητικής ομάδας του Επίκουρου Καθηγητή Γ. Βουγιουκαλάκη, τους μεταδιδακτορικούς ερευνητές Δρ. Γεώργιο Ρώτα, Δρ. Ελευθέριο Πευκιανάκη και Δρ. Αφροδίτη Πινακά, τους υποψήφιους διδάκτορες Αργυρώ Παπασταύρου και Αντώνη Καμπανάκη, τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Αγγελική Λιώρη και Δανάη Ζησιμοπούλου. Τους ευχαριστώ για την έμπρακτη βοήθειά τους στο εργαστηριακό κομμάτι της εργασίας, για τις συμβουλές τους κατά τη συγγραφή της, αλλά και για την υπέροχη συνεργασία μας αυτά τα δύο χρόνια. Τέλος, ευχαριστώ τους δικούς μου ανθρώπους για τη στήριξη και την υπομονή τους.

Η παρούσα εργασία έλαβε χρηματοδότηση από το πρόγραμμα έρευνας και καινοτομίας Horizon 2020 της Ευρωπαϊκής Ένωσης με αριθμό συμβολαίου 712921.

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 712921.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	1
ΚΑΡΚΙΝΟΣ	1
1.1 Εισαγωγή	1
1.1.2 Ορισμός και μηχανισμοί καρκινογένεσης	1
1.2 Πολύμορφο Γλοιοβλάστωμα	3
1.2.1 Εισαγωγή	3
1.2.2 Χαρακτηριστικά	4
1.3 Σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	11
ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	11
2.1 Εισαγωγή	11
2.2 Φωτοευαισθητοποιητές	14
2.3 Πρωτοπορφυρίνη ΙΧ (ΡρΙΧ).	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	
ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ	
3.1 Λειτουργία των μιτοχονδρίων	19
3.2 Παράγοντες εμφάνισης μιτοχονδριακών ασθενειών	22
3.3 Μιτοτροπικές ενώσεις ως θεραπευτική προσέγγιση	24
3.4 Τριφαινυλοφώσφινο παράγωγα ως μιτοτροπικές ενώσεις	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	
ΛΟΥΜΙΝΟΛΗ	
4.1 Ιστορική αναδρομή	29
4.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες της λουμινόλης	30
4.3 Χημειοφωταύγεια	

4.4	Μηχανισμό	ος χημειοφ	ωταύγ	ειας της λουμινόλη	ς		35
4.5 λου	Οξειδωτικ μινόλης	κά μέσα	που	χρησιμοποιούντα	στη	χημειοφωταύγεια	της 37
4.6	Χημεία της	λουμινόλι	ןג				38
4.7	Εφαρμογές	ς της λουμ	ινόλης				46
KE	ΦΑΛΑΙΟ	5					48
ΣΚ	οπος τι	ΙΣ ΕΡΓΑ	ΣΙΑΣ				48
KE	ΦΑΛΑΙΟ	6					51
Συν	/θετική	προσέ	γγιση	μιτοτροπικ	νώ	παραγώγων	της
λοι	ιμινόλης	μέσω α	κυλία	οσης αυτής			51
6.1 οξέι	Συνθετική ων και παρ	προσέγγια αγώγων τ	ση με χ ους ως	(ρήση τριφαινυλοφ ; ακυλιωτικά μέσα.	οωσφιν	ο-αλκυλο-καρβοξυλ	ικών 52
6.1.	1 Ακυλίωσι	η μέσω χλ	ωριδίω	υν οξέων			54
6.1.	2 Ακυλίωσι	η μέσω σί	ίζευξης	; με χρήση καρβοδ	ιιμιδίω	V	55
6.1.	3 Ακυλίωσι	η μέσω εν	εργοπο	οιημένου ανυδρίτη.			58
6.1.	4 Ακυλίωσι	η μέσω αν	τίδρασ	ης με εστέρα			60
6.2 ακυ	Συνθετική λιωτικών με	προσέγγι έσων	ση με	χρήση βρωμο-αλ	κυλο-κ	αρβοξυλικών οξέων	/ ως 61
6.2.	1 Ακυλίωσι	η μέσω σί	ίζευξης	; με χρήση καρβοδ	ιιμιδίων	V	62
6.2.	2 Ακυλίωσι	η μέσω χλ	ωριδία	ν οξέων			63
KE	ΦΑΛΑΙΟ	7					68
Σύν	/θεση μ	ιτοτροπ	ικών	παραγώγων	της	λουμινόλης μέ	έσω
ακι	υλίωσης ⁻	του 3-αμ	μνοφ	θαλιμίδιου			68
7.1	Σύνθεση τα	ου 5-αμινο	φθαλιμ	ιιδίου 18			69
7.2 οξέ	Συνθετική ων και παρ	προσέγγια αγώγων τ	ση με χ ους ως	(ρήση τριφαινυλοφ ; ακυλιωτικά μέσα.	οωσφιν	ο-αλκυλο-καρβοξυλ	ικών 70
7.2.	1 Ακυλίωσι	η μέσω σί	ίζευξης	; με χρήση καρβοδ	ιιμιδίω	V	71

7.2.2 Ακυλίωση μέσω χλωριδίων οξέων	71
7.2.3 Ακυλίωση μέσω ανυδριτών καρβοξυλικών οξέων	76
7.3 Συνθετική προσέγγιση με χρήση βρωμο-αλκυλο-καρβοξυλικών ακυλιωτικά μέσα	οξέων ως 80
7.3.1. Μέσω αντίδρασης σύζευξης	81
7.3.2. Μέσω αντίδρασης χλωριδίων οξέων	82
7.4. Σύνθεση των ενώσεων στόχων 3 και 4	84
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8	90
Συνθετική προσέγγιση μιτοτροπικών παραγώγ	ων της
λουμινολης μεσω θειοακυλιωσης	
8.1. Συνθετική προσέγγιση της ισοθειοκυανικής ένωσης 29	91
8.2. Συνθετική προσέγγιση των άλκυλο τριφαινυλοφωσφινο παρα πιπεραζίνης.	γώγων της 97
8.2.1. Συνθετική προσέγγιση της ένωσης 30	
8.2.2.Συνθετική προσέγγιση της ένωσης 31	100
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9	104
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔ	OMENA.
	104
9.1 Γενικό Πειραματικό Μέρος	104
9.1.1 Αντιδραστήρια και διαλύτες	104
9.1.2 Όργανα και διατάξεις	104
9.1.3 Χρωματογραφική ανάλυση και χρωματογραφικός καθαρισμός	105
9.2 Συνθετικές Μέθοδοι – Χαρακτηρισμός Ενώσεων	105
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ- ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ- ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	128
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	130

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Μηχανισμός δράσης της φωτοδυναμικής θεραπείας (PDT). Η PDT
απαιτεί τρία στοιχεία: την ακτινοβολία, ένα φωτοευαισθητοποιητή και οξυγόνο.
Όταν ο φωτοευαισθητοποιητής εκτεθεί σε συγκεκριμένα μήκη κύματος του
φωτός, διεγείρεται σε μια διεγερμένη κατάσταση και επιστρέφοντας στη
θεμελιώδη του απελευθερώνει ενέργεια, χάρη στην οποία παράγονται ενεργές
μορφές οξυγόνου (ROS), όπως οξυγόνο απλής κατάστασης και ελεύθερε ρίζες
που έχουν κυταροτοξική δράση13
Εικόνα 2.Αντιδράσεις τύπου Ι και ΙΙ στην PDT
Εικόνα 3. Η δομή της πρωτοπορφυρίνης ΙΧ (ΡΡΙΧ)17
Εικόνα 4. Τελική οξείδωση – σύστημα μεταφοράς e ⁻ – χημειώσμωση. Σύμπλοκο
Ι: NADH-αφυδρογονάση με FMN. Σύμπλοκο ΙΙ: Κυτταροχρωμική αναγωγάση με
κυτταρόχρωμα b. Σύμπλοκο ΙΙΙ: Κυτταροχρωμική οξειδάση με κυτταρόχρωμα a.
Q: Ουμπικινόνη. C: Κυτταρόχρωμα c
Εικόνα 5. Η πρόσληψη λιποφιλικών κατιόντων μέσω της λιπιδικής
διπλοστιβάδας. Αρχικά, τα TPP κατιόντα θα δεθούν ισχυρά στο εξωτερικό της
μεμβράνης, λόγω ενεργειακού ελάχιστου, κατόπιν θα περάσουν μέσω του
δυναμικού ενέργειας στο εσωτερικό, όπου και θα προσροφηθούν
Εικόνα 6. Μιτοχονδριακή πρόσληψη λιπόφιλων ΤΡΡ κατιόντων συζευγμένο με
μια αφόρτιστη ομάδα (Χ). Η πρόσληψη οδηγείται απο το Δψm και η έκταση της
πρόσληψης δίνεται από την εξίσωση Nernst
Εικόνα 7. Το ενεργειακό δίαγραμμα Jablonski δείχνει τις ενεργειακές στάθμες και
μεταπτώσεις ενός μορίου, όπου S ₀ η βασική ενεργειακή κατάσταση του μορίου,
S1 η πρώτη και S2 η δεύτερη απλή διεγερμένη, και T1 η πρώτη τριπλή
διεγερμένη
Εικόνα 8. Φάσματα ¹ Η και ³¹ Ρ NMR της ένωσης 5 σε CDCl ₃
Εικόνα 9. Φάσματα ¹ Η NMR και ³¹ Ρ της ένωσης 10 σε CDCl ₃
Εικόνα 10. Φάσματα ¹ Η NMR και ³¹ Ρ της ένωσης 12 σε CDCI _{3.}
Εικόνα 11. Φάσματα μάζας και ¹ Η NMR της ένωσης 13 σε CDCl ₃ 64
Εικόνα 12. Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 18 σε CDCl ₃

Εικόνα 13. Φάσμα ¹ Η NMR του μίγματος των ενώσεων 16 και U σε CD ₃ OD 74
Εικόνα 14. Φάσμα μάζας του μίγματος των ενώσεων 16 και U
Εικόνα 15. Φάσματα μάζας των αντιδράσεων των σχημάτων 26 (αριστερά) και 27 (δεξιά) και οι χαρακτηριστικές κορυφές των προϊόντων τους
Εικόνα 16. Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 23 σε CDCl _{3.}
Εικόνα 17. Φάσμα ¹ Η NMR του μίγματος των ενώσεων 5 και 24 σε CD ₃ OD 79
Εικόνα 18. Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 25 σε CDCl ₃
Εικόνα 19. Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 26 σε CDCl _{3.}
Εικόνα 20. Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 16 σε CDCl ₃
Εικόνα 21. Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 3 σε CDCl _{3.}
Εικόνα 22. Φάσμα ¹³ C NMR της ένωσης 3 σε CDCl ₃
Εικόνα 23. Φάσματα ΙR των προϊόντων των αντιδράσεων θειοφωσγενίου με τη λουμινόλη (μίγμα 32 και 33, κόκκινο) και την ισολουμινόλη (34, μαύρο)93
Εικόνα 24. Φάσμα ¹ Η NMR του μίγματος των ενώσεων 32 και 33 σε DMSO-d6. Πλαίσιο: Η,Η-COSY φάσμα (περιοχή αμιδικών NH)
Εικόνα 25. Φάσμα ¹³ C NMR του μίγματος των ενώσεων 32 και 33 σε DMSO-d6.
Εικόνα 26. Φάσμα μάζας του μίγματος των ενώσεων 32 και 33
Εικόνα 27. Φάσμα μάζας του μίγματος της αντίδρασης
Εικόνα 28. Φάσμα ¹ Η NMR της ένωσης 42
Εικόνα 29. Φάσμα 13C NMR της ένωσης 42

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Η πρωτονίωση και ο ταυτομερισμός της λουμινόλης σε όξινο (LH ₂) και βασικό διάλυμα (LH [–] , L ^{2–})
Σχήμα 2. Η αντίδραση χημειοφωταύγειας της λουμινόλης
Σχήμα 3. Προτεινόμενος μηχανισμός χημειοφωταύγειας της λουμινόλης σε υδατικά διαλύματα
Σχήμα 4. Οι πιθανές πορείες της αντίδρασης της λουμινόλης με ηλεκτρονιόφιλο Ε παρουσία βάσης Β
Σχήμα 5. Συνθετικές πορείες της λουμινόλης. Συνθήκες: (i) ουρία, AcOH, Δ, (ii) Fe/ NH ₄ Cl/ H ₂ O, Δ ή H ₂ , Pd/C, EtOH, (iii) NH ₂ NH ₂ ·H ₂ O, EtOH, Δ40
Σχήμα 6. Σύγκριση της χημειοφωταύγειας των παραγώγων της φθαλαζινοδιόνης
Σχήμα 7. Υποκατεστημένα παράγωγα της λουμινόλης
Σχήμα 8. Γενική αντίδραση ακυλίωσης της λουμινόλης. Συνθήκες: (α) RCOCl, πυριδίνη, DMF, rt (β) CSCl ₂ , TEA, DMF, 0°C
Σχήμα 9. Ακυλοπαράγωγα της λουμινόλης44
Σχήμα 10. Γενική αντίδραση αλκυλίωσης της λουμινόλης, όπου X=Y=Br, X=αλκάνια, αλκένια, Y=Br) και R=O, NH,NR)
Σχήμα 11. Παραδείγματα αλκυλιωμένων παραγώγων λουμινόλης και ισολουμινόλης
Σχήμα 12. Γενική επισκόπηση της αναμενόμενης δράσης της ειδικά τροποποιημένης λουμινόλης49
Σχήμα 13. Γενική δομή των μιτοτροπικών παραγώγων της λουμινόλης (ενώσεις στόχοι)
Σχήμα 14. Γενικό ρετροσυνθετικό σχήμα των ενώσεων στόχων 3 και 4, μέσω ακυλίωσης της λουμινόλης52
Σχήμα 15. Σύνθεση των οξέων 5 και 6. Συνθήκες: PPh₃, MeCN, 80 °C, o/n 52
Σχήμα 16. Αντίδραση της λουμινόλης με τα χλωρίδια των οξέων 5 και 6. Συνθήκες: (α) SOCl ₂ , Δ, 3 h, (β) TEA, DCM, rt, ο/n

Σχήμα 26. Αντίδραση του ιμιδίου 18 με το χλωρίδιο του οξέος 5. Συνθήκες: (i) SOCl₂ ή (COCl)₂, Δ, 3 h, (ii) Πυριδίνη, TEA, DCM, rt, o/n......73

Σχήμα 28. Σύνθεση της ένωσης 23. Συνθήκες: Ac₂O, πυριδίνη, DCM, rt, o/n. . 77

Σχήμα 31. Ρετροσυνθετική πορεία των ενώσεων 3 και 4
Σχήμα 32. Αντίδραση σύζευξης της ένωσης 18. Συνθήκες: DCC, DMAP, DCM, rt, o/n
Σχήμα 33. Αντίδραση του φθαλιμιδίου 18 με τα χλωρίδια των οξέων 7 και 8. Συνθήκες: (α) SOCI ₂ , Δ, 3 h, (β) ΤΕΑ, πυριδίνη, DCM, rt, o/n
Σχήμα 34. Σύνθεση των ενώσεων στόχων 3 και 4. Συνθήκες: (α) PPh ₃ , MeCN, 80 °C, 72h, (β) NH ₂ NH ₂ .H ₂ O, EtOH, 100 °C, 3h
Σχήμα 35. Γενικό ρετροσυνθετικό σχήμα των ενώσεων στόχων 30 και 31, μέσω θειοακυλίωσης της λουμινόλης91
Σχήμα 36. Αντίδραση της λουμινόλης και της ισολουμινόλης με θειοφωσγένιο. Συνθήκες: (α) CSCl ₂ , TEA, THF, 0 °C- r.t, ο/n
Σχήμα 37. Αντίδραση πυρηνόφιλης προσθήκης. Συνθήκες: πυρρολιδίνη, 1,4- διοξάνη, r.t, o/n
Σχήμα 38. Αντίδραση πυρηνόφιλης προσθήκης. Συνθήκες: (α) MePh, 110 °C, 72h, (β) piperazine (3eq), K ₂ CO ₃ , MeCN, 70 °C, 24h
Σχήμα 39. Σύνθεση της ένωσης 42. Συνθήκες: (α) i) EDC, HOBt, piperazine (4 eq), DCM, r.t., 120h, ii) EDC, piperazine (10 eq), Πυριδίνη (0.8 eq) ,DCM, ^o 0 C- r.t., 120h
Σχήμα 40. Αντίδραση πυρηνόφιλης προσθήκης. Συνθήκες(α) i) DCM, rt, 24h, ii) DCM, rt, 48h, iii) DMF, rt, 24h

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΚΑΡΚΙΝΟΣ

1.1 Εισαγωγή

Ο καρκίνος θεωρείται μια από τις σοβαρότερες ασθένειες που σήμερα παρατηρούνται στις αναπτυγμένες χώρες. Η ονομασία της εν λόγω πάθησης αποδίδεται στον Ιπποκράτη το 400 π.Χ., ο οποίος ήταν ο πρώτος που παρατήρησε την νόσο και προσπάθησε να την περιγράψει.¹ Οι στατιστικές δείχνουν ότι αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες και συνήθως προσβάλλει ανθρώπους μεγάλης ηλικίας. Υπάρχουν ωστόσο και μορφές καρκίνου που εμφανίζονται σε νεαρής ηλικίας άτομα, ακόμη και σεπαιδιά.

1.1.2 Ορισμός και μηχανισμοί καρκινογένεσης.

Ο καρκίνος είναι μια ομάδα ασθενειών ή διαταραχών που χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτη διαίρεση κυττάρων καθώς και τη δυνατότητα αυτών των κυττάρων να εισβάλουν σε άλλους ιστούς, είτε από την άμεση αύξηση στον παρακείμενο ιστό μέσω εισβολής, είτε από την εμφύτευση σε απόμακρες περιοχές μέσω μετάστασης. Ο μετασχηματισμός ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, κατά την οποία τροποποιούνται οι μηχανισμοί ελέγχου της διαίρεσης και γήρανσης του κυττάρου, η αλληλεπίδραση του με τα γειτονικά κύτταρα και η ικανότητα του να διαφεύγει την εποπτεία του ανοσοποιητικού συστήματος.²Αυτές οι τροποποιοήσεις περιοχάζουν γενετικές αλλαγές στην αλληλουχία του DNA, καθώς και αλλοιώσεις σε μηχανισμούς που καθορίζουν την έκφραση του γενετικού κώδικα, χωρίς όμως να επηρεάζουν την αλληλουχία DNA. Οι τελευταίες αλλαγές αποκαλούνται επιγενετικές (π.χ. αλκυλίωση του DNA). Με λίγα λόγια, ο καρκίνος σχετίζεται με μια σειρά αλλοιώσεων/μεταλλάξεων σε γονίδια που ελέγχουν την κυτταροδιαίρεση, γήρανση του κυττάρου.

Διάφορες μεταλλάξεις μπορούν να γίνουνπροκειμένου ένα κανονικό κύτταρο να μετασχηματιστεί σε κακοήθες. Σύμφωνα με πορίσματα σειράς πειραματικών

μελετών,^{22,23,24} για τον μετασχηματισμό ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό απαιτείται η παραβίαση τριών θεμελιωδών μηχανισμών ελέγχου.

Ο πρώτος μηχανισμός αφορά την ενεργοποίηση της κυτταρικής διαίρεσης μετά τη λήψη κατάλληλου εξωτερικού ερεθίσματος (ορμόνης ή άλλου αυξητικού παράγοντα). Σε ένα καρκινικό κύτταρο ο μηχανισμός διαίρεσης είναι συνέχεια ανοιχτός, συμβάλλοντας στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Τα μεταλλαγμένα γονίδια που σχετίζονται με την απορρύθμιση του παραπάνω μηχανισμού, και επομένως προάγουν τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου, ονομάζονται ογκογονίδια. Ο δεύτερος κανόνας υπαγορεύει την ενεργοποίηση αυτοκαταστροφικών μηχανισμών στην περίπτωση που το κύτταρο βρεθεί σε συνθήκες ακατάλληλες για την ασφαλή αντιγραφή του DNA. Αυτοί οι μηχανισμοί ελέγχονται από μια κατηγορία γονιδίων, τα ογκοκατασταλτικά. Τα τελευταία, σε φυσιολογικές συνθήκες, καταστέλλουν τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό του κυττάρου, όμως μείωση ή απώλεια της λειτουργίας τους, σαν αποτέλεσμα μεταλλάξεων, συμβάλλει στην εμφάνιση της νόσου. Τελευταίος, αλλά εξίσου σημαντικός, είναι ο μηχανισμός ελέγχου που επιτρέπει την πραγματοποίηση περιορισμένου αριθμού διαιρέσεων από το ίδιο γονεϊκό κύτταρο. Με άλλα λόγια το κύτταρο περιέχει έναν "εσωτερικό μετρητή" που εμποδίζει την αντιγραφή του DNA πέραν του ενός προκαθορισμένου αριθμού επαναλήψεων. Ο μετρητής αυτός ονομάζεται τελομερές και αποτελείται από μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία νουκλεοτιδίων DNA στην άκρη κάθε χρωμοσώματος. Όταν το μήκος του τελομερούς γίνει αρκετά μικρό, το κύτταρο δεν μπορεί να διαιρεθεί περαιτέρω και εισέρχεται στη φάση της γήρανσης ή οδηγείται στον θάνατο μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης. Στα καρκινικά κύτταρα η ενεργοποίηση ενός ενζύμου που ονομάζεται τελομεράση επιτρέπει την προσθήκη νέων επαναλήψεων στο τέλος των χρωμοσωμάτων, επιτρέποντας την απεριόριστη αντιγραφή του γονιδιώματός τους.

Η ταυτόχρονη παράκαμψη και των τριών παραπάνω μηχανισμών ελέγχου σε μοριακό επίπεδο δεν είναι μια απλή διαδικασία. Εξετάζοντας κάθε μηχανισμό ανεξάρτητα, κάθε μια από τις παραπάνω παραβιάσεις μπορεί να διαταράξει την ομαλή λειτουργία του κυττάρου και να οδηγήσει σε αποπτωτικό θάνατο, έναν τύπο "κυτταρικής αυτοκτονίας" που συμβάλλει στον αφανισμό των μη φυσιολογικών κυττάρων. Η γενετική προδιάθεση και αλλοιώσεις στο περιβάλλον

2

του κυττάρου συμβάλλουν αφενός στη μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης ταυτόχρονων μεταλλάξεων σε ένα κύτταρο και αφετέρου στη μεγαλύτερη πιθανότητα επιβίωσης των μη φυσιολογικών κυττάρων σε διαταραγμένες συνθήκες έναντι των φυσιολογικών κυττάρων.³⁻⁷

1.2 Πολύμορφο Γλοιοβλάστωμα

1.2.1 Εισαγωγή

Οι όγκοι του νευρικού συστήματος αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 2% των κακοηθειών σε παγκόσμιο επίπεδο. Η ηλικιακή κατανομή αυτής της κατηγορίας όγκων παρουσιάζει δύο κορυφές, με την πρώτη στα παιδιά (3-12 ετών) και τη ενήλικες ηλικίας 45-70.⁹ Το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα δεύτερη σε (Glioblastoma Multiforme, GBM) αποτελεί την πιο κοινή μορφή γλοιωμάτων του 50% των εγκεφάλου, αντιπροσωπεύοντας περίπου το πρωτοπαθών περιστατικών. Το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα παραμένει ενάς από τους πιο κοινούς και επιθετικούς, κακοήθεις καρκίνους στις μέρες μας και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) τον κατατάσσει ως αστροκύτωμα τετάρτου βαθμού (το αστροκύτωμα είναι τύπος γλοιώματος που μπορεί να παρουσιαστεί οπουδήποτε στο κεντρικό νευρικό σύστημα δηλαδή στον εγκέφαλο και στον νωτιαίο μυελό). Προέρχεται από τα νευρογλοιακά κύτταρα και ανήκει στην κατηγορία των πρωτογενών όγκων του εγκεφάλου.⁸ Αυτό σημαίνει ότι αναπτύσσεται από αυτοφυή κύτταρα του εγκεφάλου και δεν είναι αποτέλεσμα μετάστασης στον εγκέφαλο καρκινικών κυττάρων από διαφορετικές περιοχές του σώματος. Ανάλογα τον ρυθμό ανάπτυξης, τα γλοιώματα διακρίνονται σε αυτά του χαμηλού βαθμού (Ι, ΙΙ) και αυτά του υψηλού βαθμού (ΙΙΙ, ΙV). Αυτά τα είδη όγκων είναι βαθμού ΙV και περιέχουν διάφορα είδη κυττάρων, εξ' ου και το όνομα πολύμορφο (multiforme), με σημαντικότερα τα αστροκύτταρα. Τα φυσιολογικά αστροκύτταρα είναι σε σχήμα αστεριού και δίνουν στο εγκέφαλο το χαρακτηριστικό του σχήμα, ενώ είναι ο πιο κοινός τύπος κυττάρων του εγκεφάλου που έχει την προδιάθεση να γίνει όγκος (αστροκύττωμα). Παρουσιάζει μέγιστο στις ηλικίες 65-74 με μεγαλύτερη συχνότητα στους άντρες.⁹ Παρά τις εξελίξεις που έχουν σημειωθεί τα τελευταία 40 χρόνια στους κλάδους της μικροχειρουργικής και της ακτινοθεραπείας, και παρά την ανάπτυξη

καινοτόμων χημειοθεραπευτικών παραγόντων,⁹ το προσδόκιμο όριο ζωής ασθενών που πάσχουν από το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα είναι 12 μήνες, ενώ ποσοστό μικρότερο από 3% επιβιώνει περισσότερο από τρία έτη μετά την διάγνωση της ασθένειας.⁸

Σχέση του γλοιοβλαστώματος με το κάπνισμα, τη διατροφή, τα κινητά τηλέφωνα ή τα ηλεκτρομαγνητικά πεδία δεν έχει επιβεβαιωθεί. Μικρός συσχετισμός φαίνεται να υπάρχει μεταξύ γλοιοβλαστώματος και ιονίζουσας ακτινοβολίας. Μεταξύ των παραγόντων που έχουν σχετιστεί με το γλοιοβλάστωμα είναι έκθεση σε βινυλοχλωρίδιο (υλικό που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του PVC), σε μόλυβδο στο περιβάλλον εργασίας και επαγγέλματα όπως αγρότες, μεταλλοτεχνίτες και πυροσβέστες. Παρόλα αυτά, κανένας από τους παραπάνω συσχετισμούς δεν έχει αδιάψευστα επιβεβαιωθεί και η αιτιολογία των καρκίνων του εγκεφάλου γενικότερα περιμένει ακόμα να αποσαφηνιστεί.⁹

1.2.2 Χαρακτηριστικά

Όπως και πολλοί άλλοι τύποι όγκου του εγκεφάλου, η ακριβής αιτία του πολύμορφου γλοιοβλαστώματος δεν είναι γνωστή, αλλά έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα υποδεικνύουν την συσχέτιση εμφάνισης τους με γενετικές μεταλλάξεις, προκλειόμενες από περιβαλλοντικούς και κληρονομικούς παράγοντες.

Τα πολύμορφα γλοιοβλαστώματα εμφανίζουν τα εξής χαρακτηριστικά:

- Η βιολογία των γλοιοβλαστωμάτων είναι μοναδική. Η συντριπτική πλειοψηφία των γλοιοβλαστωμάτων υποτροπιάζει εντός των 2 εκατοστών της περιοχής εμφάνισης του καρκινικού όγκου, ενώ η πιθανότητα μετάστασης του όγκου είναι σχετικά μικρή.
- Οι περισσότεροι από αυτούς τους όγκους αναπτύσσονται κυρίως στα εγκεφαλικά ημισφαίρια, αλλά μπορεί να αναπτυχθούν και σε άλλα μέρη του εγκεφάλου, όπως το μεσολόβιο σώμα, το σύνδεσμο των δύο εγκεφαλικών ημισφαιρίων μέσω νευρικών ινών, το εγκεφαλικό στέλεχος, το οπίσθιο μέρος του εγκεφάλου, που αποτελεί συνεχές του νωτιαίου

μυελού, ή το νωτιαίο μυελό. Στα παιδιά, η εμφάνιση αυτών των όγκων πέρα από τα εγκεφαλικά ημισφαίρια είναι σπάνια.

- Ο μέσος όρος προσδόκιμου χρόνου ζωής είναι 15 μήνες, ενώ μόλις το 5% των ασθενών επιβιώνουν για διάστημα 5 χρόνων.
- Μπορούν να αποτελούνται από πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων.
- Τα κύτταρα των όγκων αυτών αναπτύσσονται γρήγορα και μπορούν εξαπλωθούν σε όλη την περιοχή του εγκεφάλου, με αποτέλεσμα οι όγκοι αυτοί να είναι ως επί των πλείστον διηθητικοί και μη προσβάσιμοι.
- Πιο συχνά εμφανίζεται σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας και στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες.
- Τα κύτταρα των όγκων αυτών αναπτύσσονται γρήγορα και μπορούν εξαπλωθούν σε όλη την περιοχή του εγκεφάλου, με αποτέλεσμα οι όγκοι αυτοί να είναι ως επί των πλείστον διηθητικοί και μη προσβάσιμοι.
- Περιλαμβάνουν μία ετερογενή ομάδα νεοπλασματικών αστροκυττάρων που διαφοροποιούνται στην θέση μέσα στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, στο ρυθμό ανάπτυξης, στην έκταση διείσδυσης τους και στην βαθμό απόκρισης τους στις διάφορες θεραπευτικές αγωγές.
- Κατατάσσονται στο βαθμό ΙV, την πιο σοβαρή μορφή αστροκυττωμάτων.
 Αυτού του είδους γλοιώματα αναπτύσσονται από τη γενεαλογία των κυττάρων νευρογλοίας σε σχήμα αστεριού, που ονομάζονται αστροκύτταρα και υποστηρίζουν τα νευρικά κύτταρα.

1.3 Σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

Η σύγχρονη προσέγγιση της αντιμετώπισης του καρκίνου, ακόμα και σε επίπεδο έρευνας και εκπαίδευσης, στρέφεται κυρίως στις τεχνικές διάγνωσης και θεραπείας και πολύ λιγότερο στην πρόληψη. Υπάρχουν πολλά είδη θεραπείας του καρκίνου ανάλογα με την μορφή του καρκίνου (μικροκυτταρικός ή μη μικροκυτταρικός) που έχει εμφανίσει ο ασθενής και το στάδιο στο οποίο βρίσκεται ο καρκίνος. Τα κύρια είδη θεραπείας του διακρίνονται στα εξής:

1. Χειρουργική επέμβαση.

Χρησιμοποιείται για να αφαιρεθεί ο καρκινικός όγκος (μαζί με περιβάλλοντες ιστούς που είναι πιθανόν να περιέχουν καρκινικά κύτταρα) είτε για την πλήρη θεραπεία του καρκίνου είτε για την ανακούφιση των συμπτωμάτων του. Μπορεί να συνδυαστεί με ακτινοθεραπεία ή χημειοθεραπεία, πριν ή μετά τη χειρουργική επέμβαση. Ορισμένες φορές, είτε δεν είναι δυνατή αυτού του είδους θεραπεία, λόγω της περιοχής εμφάνισης του καρκίνου, είτε δεν είναι αποτελεσματικό και μόνιμο το αποτέλεσμα.

2. Ακτινοθεραπεία.

Η εξέλιξη της τεχνολογίας επιτρέπει πλέον τη θεραπευτική δράση της ιονίζουσας ακτινοβολίας στην πρόκληση μοιραίων πληγμάτων στη διπλή έλικα του DNA, τα οποία υπονομεύουν την ικανότητα διπλασιασμού και ανάπτυξης του κυττάρου και επιφέρουν τον θάνατό του, συνήθως μετά από έναν μικρό αριθμό μιτωτικών διαιρέσεων.^{11,12}

3. Χημειοθεραπεία.

Χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις που καθιστάται αδύνατη η θεραπεία του καρκίνου μέσω τοπικών θεραπευτικών μεθόδων (χειρουργική επέμβαση ή ακτινοθεραπεία) και αναφέρεται στη χρήση κυτταροτοξικών φαρμάκων που στοχεύουν κυρίως στα καρκινικά κύτταρα, αλλά και στα υγιή, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν σημαντικές παρενέργειες στον ανθρώπινο οργανισμό.¹⁰⁻¹³

4. Στοχευμένη θεραπεία.

Αναστέλλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και την μετάσταση του καρκίνου παρεμβαίνοντας στοχευμένα σε συγκεκριμένα μόρια (μόρια στόχοι) που σχετίζονται με την καρκινογένεση και την ανάπτυξη του όγκου και όχι απλώς παρεμβαίνοντας στα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα του οργανισμού (όπως γίνεται με την χημειοθεραπεία).¹⁷ Οι σύγχρονοι τύποι στοχευμένης θεραπείας θεωρούνται πιο αποτελεσματικοί και λιγότερο επιβλαβείς για τα φυσιολογικά κύτταρα και περιλαμβάνουν τη χρήση μικρών μορίων,

μονοκλωνικών αντισωμάτων, όπως είναι οι αναστολείς των κινασών της τυροσίνης¹⁴⁻¹⁶ και αντι-αγγειογενετικών φαρμάκων.

5. Φωτοδυναμική θεραπεία.

Βασίζεται στην ακτινοβόληση του όγκου με ακτινοβολία που έγκειται στην ορατού περιοχή TOU φωτός βοήθεια κατάλληλων Jμ την φωτοευαισθητοποιητών.¹⁷⁻²⁵ Συγκεκριμένα, όταν οι τελευταίοι εκτεθούν σε ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος παράγουν δραστικές μορφές οξυγόνου που μπορεί να καταστρέψουν τους γειτονικούς ιστούς. Το μήκος κύματος καθορίζει το πόσο βαθιά μπορεί να φτάσει η ακτινοβολία μέσα στον οργανισμό ώστε να δράσει.¹⁹⁻²⁰ Οι σύγχρονες μέθοδοι φωτοδυναμικής θεραπείας συνδυάζονται με θεραπείες, όπως η χειρουργική επέμβαση, ακτινοθεραπεία, ή χημειοθεραπεία, και αποτελούν έναν πολλά υποσχόμενο τομέα της θεραπείας του καρκίνου.²¹

6. Άλλες μέθοδοι.

Άλλες μέθοδοι, συνήθως λιγότερο αποτελεσματικές, είναι η ανοσοθεραπεία, η ορμονοθεραπεία και η μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων (ή μυελού των οστών).

Γενικά, για ασθενείς που πάσχουν από εγκεφαλικούς όγκους, η πρόγνωση εξαρτάται από πολλούς παράγοντες που περιλαμβάνουν την ηλικία, την συνολική κατάσταση της υγείας του ασθενούς, το μέγεθος και τον τύπο του όγκου, την μορφολογία και τη σύσταση του, καθώς και τη θέση εμφάνισης του ως προς την προσβασιμότητά του. Όσον αφορά το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, δεν υπάρχει σαφής τρόπος πρόληψης της νόσου, όπως και της θεραπείας του. Η θεραπεία του στοχεύει στην ανακούφιση του πόνου και των διάφορων συμπτωμάτων του, στην βελτίωση της ποιότητας ζωής και στο προσδόκιμο χρόνο ζωής του ασθενούς. Εντούτοις, το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα είναι πολύ δύσκολο να αντιμετωπιστεί και αυτό οφείλεται σε διάφορους παράγοντες:

Αυτού του είδους οι όγκοι περιέχουν πολλούς διαφορετικούς τύπους
 κυττάρων. Μερικά κύτταρα μπορούν να ανταποκρίνονται καλά σε

ορισμένες θεραπείες, ενώ άλλα μπορεί να μην επηρεάζονται καθόλου από αυτές.

- Ο εγκέφαλος είναι επιρρεπής σε βλάβες που προκαλούνται από συμβατικές θεραπείες.
- Ο εγκέφαλος έχει μια πολύ περιορισμένη ικανότητα να επιδιορθώσει το πρόβλημα.
- Πολλά φάρμακα δεν μπορούν να διασχίζουν το φράγμα αίματοςεγκεφάλου για να δρουν επί του όγκου.

Για όλους τους παραπάνω λόγους, για την αποτελεσματική θεραπεία του πολύμορφου γλοιοβλαστώματος έχουν συνδυαστεί οι παρακάτω θεραπευτικές προσεγγίσεις:

- Η πρωταρχική αντιμετώπισή του περιλαμβάνει ανοικτή κρανιοτομία με χειρουργική εκτομή του μεγαλύτερου δυνατού τμήματος του όγκου. Παρ' ολ' αυτά, σε περιοχές υψηλού κινδύνου του εγκεφάλου, μπορεί να μην είναι δυνατή η αφαίρεση όλων των τμημάτων των όγκων. Γι 'αυτό το λόγο, το σχέδιο θεραπείας συνήθως περιλαμβάνει επιπρόσθετη θεραπεία για να καταστρέψει τα εναπομείναντα καρκινικά κύτταρα.
- Η ακτινοθεραπεία χρησιμοποιεί δέσμη φωτονίων Χ υψηλής ενέργειας από γραμμικούς επιταχυντές ή δέσμη φωτονίων γ από μονάδες κοβαλτίου (⁶⁰Co), για να σταματήσει ή να επιβραδύνει την ανάπτυξη των όγκων που δεν είναι χειρουργίσιμοι και να σκοτώσει όσο το δυνατόν περισσότερα καρκινικά κύτταρα έχουν απομείνει μετά την επέμβαση. Η επιλογή της κατάλληλης ενέργειας φωτονίων εξαρτάται από το βάθος του όγκου. Για τη θεραπεία επιφανειακών όγκων ή όγκων μικρού βάθους, περισσότερο κατάλληλες είναι οι δέσμες ηλεκτρονίων, οι οποίες επίσης παράγονται από γραμμικούς επιταχυντές, ενώ πιο εξεζητημένες τεχνικές αφορούν τη χρήση σωματιδιακής ακτινοβολίας, με πιο χαρακτηριστική αυτή των πρωτονίων. Ειδικότερα, η ακτινοθεραπεία κλειστών πηγών ή βραχυθεραπεία είναι μια επεμβατική μορφή θεραπείας κατά την οποία ραδιενεργές πηγές εγκλεισμένες σε περίβλημα τοποθετούνται μέσα στο

προσβεβλημένο όργανο. Οι πηγές αυτές κατευθύνονται σε προκαθορισμένες θέσεις μέσα στον οργανισμό και παραμένουν σε αυτές για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, διαμορφώνοντας, με αυτόν τον τρόπο, την επιθυμητή κατανομή της δόσης στον όγκο-στόχο. Η τεχνική αυτή επιτυγχάνει την τοπική, αποτελεσματική ακτινοβόληση του όγκου σε όλη του την έκτασή του, με ελαχιστοποίηση της δόσης στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς. Τέλος, η ακτινοθεραπεία ανοιχτών πηγών αφορά τη θεραπευτική χορήγηση ραδιοϊσοτόπων στη συστημική κυκλοφορία με έγχυση ή κατάποση.

 Η χημειοθεραπεία χρησιμοποιεί φάρμακα για να σταματήσει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Η λήψη τους μπορεί να πραγματοποιηθεί από το στόμα, με ενδοφλέβια ή ενδομυϊική ένεση, ή απευθείας σε ένα μέρος του σώματος. Μερικά φάρμακα χημειοθεραπείας καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα ή αποτρέπουν την αναπαραγωγή τους αλλάζοντας το περιβάλλον γύρω από τον όγκο. Άλλα φάρμακα μπορούν να βοηθήσουν στη διαχείριση των συμπτωμάτων του γλοιοβλαστώματος, μειώνοντας το οίδημα γύρω από τον όγκο, τις επιληπτικές κρίσεις ελέγχου, τη ναυτία, τον έμετο, τον πόνο κ.α. Το πιο χημειοθεραπείας που χρησιμοποιείται KOIVÓ φάρμακο είναι η τεμοζολομίδη. Γενικά, η χημειοθεραπεία μπορεί να προκαλέσει βραχυπρόθεσμες παρενέργειες, αλλά αυτές σήμερα είναι λιγότερο τοξικές από οτι στο παρελθόν.

Μελέτες έχουν δείξει ότι ο συνδυασμός ακτινοθεραπείας με χορήγηση τεμοζολομίδης ως επικουρική θεραπεία δίνει καλύτερα ποσοστά επιβίωσης σε σύγκριση με την εφαρμογή μόνο ακτινοθεραπείας.^{26,28} Ωστόσο, λόγω του ότι η συστηματική χορήγηση χημειοθεραπείας έχει πενιχρά αποτελέσματα, διάφορα νέα πειραματικά θεραπευτικά πρωτόκολλα περιλαμβάνουν τεχνικές παράκαμψης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, όπως τοπικές εκχύσεις φαρμάκων (π.χ. καρμουστίνη, τοποτεκάνη) και τοποθέτηση εμφυτευμάτων (π.χ. πολυμερή καρμουστίνης), διάφορες ανοσολογικές προσεγγίσεις όπως εμβόλια, γονιδιακή θεραπεία και χορήγηση εμβρυϊκών κυττάρων.

Αν και τα συνολικά ποσοστά θνησιμότητας παραμένουν σε υψηλά επίπεδα, η έρευνα στο πεδίο διεθνώς οδηγεί στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών και γονιδιακών μεταλλάξεων, η οποία σε συνδυασμό με τις κλινικές δοκιμές στοχεύουν σε πιο ελπιδοφόρες και προσαρμοσμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Πολλαπλές προκλήσεις όμως παραμένουν, συμπεριλαμβανομένης της ετερογένειας και της εντόπισης του όγκου σε μια περιοχή όπου είναι πέρα από την προσιτότητα των τοπικών ελέγχων και της ταχείας, επιθετικής υποτροπής του όγκου. Ως εκ τούτου, η θεραπεία των ασθενών με κακοήθη γλοιώματα περιλαμβάνει χειρουργική επέμβαση, ακτινοθεραπεία, και χημειοθεραπεία και παραμένει ανακουφιστική, αλλά δεν αποτελεί πανάκεια. Γι 'αυτό το λόγο, μια καινοτόμα προσέγγιση, όπως η φωτοδυναμική θεραπεία μέσω ειδικά σχεδιασμένων ενώσεων για την καταπολέμηση του πολύμορφου γλοιοβλαστώματος είναι δύσκολο, αλλά αρκετά ελπιδοφόρο εγχείρημα.31-36

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

2.1 Εισαγωγή

Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μια σχετικά σύγχρονη τεχνική αντιμετώπισης του καρκίνου και άλλων ασθενειών. Παρ'όλο που ιστορικά η φωτοευαισθητοποίηση έχει τις ρίζες της στην αρχαία Αίγυπτο,^{25,26} εν τούτοις, μόλις το 1978 πραγματοποιήθηκε η πρώτη κλινική εφαρμογή της θεραπευτικής αυτής τεχνικής στον άνθρωπο από την ομάδα του T.J. Dougherty στην κλινική Mayo των Η.Π.Α.^{28,29}

Η φωτοδυναμική θεραπεία (PhotoDynamicTherapy-PDT) έχει αναδειχθεί ως μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική τεχνική στην αντιμετώπιση συμπαγών κυρίως καρκινικών όγκων, όπως και άλλων μη κακοηθών, εξαιτίας του ότι παρουσιάζει επιλεκτικότητα στην καταστροφή των καρικινικών ιστών συγκριτικά με τους γειτονικούς υγιείς ιστούς. Η αντιμετώπιση των όγκων κατά τις εφαρμογές της PDT βασίζεται γενικά στη φωτοευαισθητοποίηση καρκινικών όγκων, μετά την χορήγηση κάποιου φωτοευαισθητοποιητή (και τη μετέπειτα ενεργοποίηση αυτού) με την χρήση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (κυρίως ακτινοβολίας laser) κατάλληλων φασματικών χαρακτηριστικών.²³ Η φωτοδυναμική θεραπεία βασίζεται στην φωτοοξείδωση της βιολογικής ύλης στον ιστό-στόχο μέσω φωτοευαισθητοποιητών ουσιών^{27,28} και διακρίνεται στα παρακάτω στάδια:

Εισαγωγή του φωτοευαισθητοποιητή στον οργανισμό. Ένα πλεονέκτημα της PDT είναι ότι ο φωτοευαισθητοποιητής μπορεί να χορηγηθεί στον οργανισμό μέσω 2 πιθανών τρόπων: α) εξωγενώς, που περιλαμβάνει την χορήγησή του μέσω τοπικής εφαρμογής ή ενδοφλέβιας ένεσης και στηρίζεται στην εκλεκτική πρόσληψή του από τον ιστό ή όγκο-στόχο και β) ενδογενώς, όπου μια πρόδρομη μη φωτοενεργή ένωση μετατρέπεται σε φωτοδραστική. Κατά κανόνα, οι ευαισθητοποιητές που έχουν μελετηθεί μέχρι στιγμής παρουσιάζουν έντονη συγγένεια για όλους τους ιστούς του δικτυο-ενδοθηλιακού συστήματος, όμως ποικίλλουν σημαντικά

τα χρονικά διαστήματα μεταξύ της χορήγησης του ευαισθητοποιητή, του μεγίστου ευαισθητοποίησης, και του χρόνου κατακράτησης στους ιστούς.

 Ακτινοβόληση του νοσούντα ιστού με ακτινοβολία μήκους κύματος αντίστοιχο με αυτό της απορρόφησης του ευαισθητοποιητή που έχει εισαχθεί στον οργανισμό.

Παρά τις σημαντικές έρευνες που έχουν λάβει χώρα μέχρι σήμερα,²⁸⁻²⁹ ο μηχανισμός δράσης της PDT δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός, αλλά έχουν προταθεί δύο πιθανές πορείες. Ειδικότερα, μετά την απορρόφηση της ακτινοβολίας (φωτόνια), ο ευαισθητοποιητής διεγείρεται από την θεμελιώδη του κατάσταση στην πρώτη απλή διεγερμένη, η οποία μεταπίπτει στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση. Αυτή η κατάσταση μπορεί να υποβληθεί σε δύο είδη αντιδράσεων (εικόνα 1). Πρώτον, μπορεί να αντιδράσει με ένα υπόστρωμα, όπως η κυτταρική μεμβράνη ή ένα μόριο, και να μεταφέρει ένα άτομο υδρογόνου ή ηλεκτρόνιο προς σχηματισμό ριζών (αντίδραση τύπου Ι), οι οποίες με την σειρά τους αλληλεπιδρούν με οξυγόνο, προς σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species – ROS), όπως οξυγόνο απλής κατάστασης (102), ρίζες υδροξυλίου ή υπεροξειδίου. Αυτές, με τη σειρά τους, αντιδρούν με κάποιο υπόστρωμα για να παραχθούν οξειδωμένα προϊόντα. Εναλλακτικά, η τριπλή κατάσταση μπορεί να αντιδράσει απευθείας με το οξυγόνο (αντίδραση τύπου ΙΙ), μεταφέροντας σε αυτό την ενέργειά της, διεγείρωντάς το σε οξυγόνο απλής κατάστασης. Έπειτα πάλι, το ¹O₂ αντιδρά με κάποιο υπόστρωμα προς σχηματισμό οξειδωμένων προϊόντων. Αυτοί οι δύο τύποι αντιδράσεων μπορούν να πραγματοποιούνται και ταυτοχρόνως και η αναλογία μεταξύ τους εξαρτάται από τον τύπο του ευαισθητοποιητή που χρησιμοποιήθηκε, τις συγκεντρώσεις του υποστρώματος και του οξυγόνου, καθώς και τη συγγένεια πρόσδεσης του ευαισθητοποιητή με το υπόστρωμα.



Εικόνα 1. Μηχανισμός δράσης της φωτοδυναμικής θεραπείας (PDT). Η PDT απαιτεί τρία στοιχεία: την ακτινοβολία, ένα φωτοευαισθητοποιητή και οξυγόνο. Όταν ο φωτοευαισθητοποιητής εκτεθεί σεσυγκεκριμένα μήκη κύματος του φωτός, διεγείρεται σε μια διεγερμένη κατάσταση και επιστρέφοντας στη θεμελιώδη του απελευθερώνει ενέργεια, χάρη στην οποία παράγονται ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS), όπως οξυγόνο απλής κατάστασης και ελεύθερες ρίζες που έχουν κυτταροτοξική δράση.



Εικόνα 2.Αντιδράσεις τύπου Ι και ΙΙ στην PDT.

Επιπροσθέτως, αυτές οι αντιδράσεις συμβαίνουν στην τοπική περιοχή απορρόφησης φωτός από τον φωτοευαισθητοποιητή. Επομένως, οι βιολογικές αποκρίσεις προς τον φωτοευαισθητοποιητή ενεργοποιούνται μόνο στις συγκεκριμένες περιοχές του ιστού-στόχου που έχουν εκτεθεί στο φως.²³ Λόγω της υψηλής δραστικότητας και του μικρού χρόνου ημιζωής των ROS, μόνο τα κύτταρα που είναι πλησίον της περιοχής παραγωγής ROS (περιοχές εντοπισμού του φωτοευαισθητοποιητή) επηρεάζονται άμεσα. Ενδεικτικά, ο χρόνος ημιζωής του οξυγόνου απλής κατάστασης σε βιολογικά συστήματα είναι <0,04 μs και, ως εκ τούτου, η ακτίνα της δράσης του οξυγόνου απλής κατάστασης είναι <0,02 μm.³³

2.2 Φωτοευαισθητοποιητές

Ως φωτοευαισθητοποιητές χαρακτηρίζονται οι ουσίες εκείνες, οι οποίες, ενεργοποιούμενες από φωτεινή ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, παράγουν χημικώς ενεργά προϊόντα, όπως μονήρες οξυγόνο, ελεύθερες ρίζες, κ.ά. Από την εποχή που ξεκίνησαν οι μελέτες για πιθανές εφαρμογές της φωτοδυναμικής θεραπείας σε καρκινικούς όγκους, μεγάλο πλήθος διαφορετικών ουσιών έχουν δοκιμασθεί επιτυχώς ή ανεπιτυχώς. Καμία όμως από τις ουσίες αυτές δεν συγκεντρώνει τα απαραίτητα χαρακτηριστικά, τα οποία θα την καταστήσουν ιδανική ως φωτοευαίσθητη ουσία. Η ιδανική φωτοευαίσθητη ουσία για εφαρμογές φωτοδυναμικής θεραπείας, πρέπει να είναι απλή σε σύνθεση, μη τοξική, να αποτελεί σταθερό παράγωγο γνωστής χημικής δομής, το οποίο να κατακρατείται με υψηλό βαθμό επιλεκτικότητας από καρκινικούς όγκους-ιστούς, συγκριτικά με τους γειτονικούς προς την περιοχή εκείνη υγιείς ιστούς. Επίσης, πρέπει να απορροφά στην περιοχή του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας όπου το φως παρουσιάζει σχετικά μεγάλο βάθος διείσδυσης στους ιστούς (δηλαδή στην ερυθρή και εγγύς υπέρυθρη περιοχή του φάσματος 600-1100 nm) και όπου η ενέργεια των φωτονίων είναι αρκετή, για να επάγει την παραγωγή ελευθέρων ριζών, όπως οξυγόνο απλής κατάστασης. Ακόμη, ο φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να εμφανίζει πολύ χαμηλή απορρόφηση (ή αν αυτό είναι δυνατόν να μην απορροφά καθόλου) στην περιοχή μηκών κύματος 300- 600 nm, όπου εμφανίζεται η μέγιστη ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας, ώστε να ελαττωθεί ο κίνδυνος φωτοευαισθητοποίησης και παρεπόμενων εγκαυμάτων κατά την έκθεση σε ηλιακή ακτινοβολία. Τέλος, πρέπει να μεταβολίζεται άμεσα μετά την θεραπεία, ώστε να μην προκαλεί παρατεταμένη φωτοευαισθησία στον ασθενή. Οι φωτοευαισθητοποιητές, γενικά κατακρατούνται επιλεκτικά από τους καρκινικούς όγκους σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό από ότι από τους υγιείς ιστούς (λόγος κατακράτησης καρκινικού: υγιούς ιστού έως 30:1) και χωρίς να ενεργοποιηθούν από κατάλληλη οπτική ακτινοβολία παρουσιάζονται μη

14

τοξικοί. Ενεργοποιούμενοι από κατάλληλη ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία παράγουν ελεύθερες ενεργές μορφές οξυγόνου (όπως οξυγόνο απλής κατάστασης, ρίζα του υδροξυλίου, κ.λ.π.) οι οποίες αντιδρούν με τα αμινοξέα, τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και τα νουκλεϊκά οξέα, καταστρέφοντας τα καρκινικά κύτταρα και παρέχοντας το επιθυμητό θεραπευτικό αποτέλεσμα.³⁷⁻⁴⁰

Κατά καιρούς, έχουν δοκιμασθεί πειραματικά και έχουν επικρατήσει ως φωτοευαισθητοποιητές (ή ενώσεις που προκαλούν την παραγωγή φωτοευαισθητοποιητών) για χρήση σε εφαρμογές φωτοδυναμικής θεραπείας διάφορες τέτοιες ουσίες, όπως παράγωγα της αιματοπορφυρίνης (HpDPhotofrin I) και του εστέρα της διαιματοπορφυρίνης (DHE- Photofrin Π), φθαλοκυανίνες (Pc) και μεταλλοφθαλοκυανίνες (παράγωγα φθαλοκυανινών αλουμινίου (AIPc) και παράγωγα φθαλοκυανινών ψευδαργύρου (ZnPc)), η χλωρίνη β6, βενζοπορφυρίνες, σύμπλοκα των μετάλλων μετάπτωσης, κ.ά.^{41,56,135,136}

2.3 Πρωτοπορφυρίνη ΙΧ (ΡρΙΧ).

Οι πορφυρίνες είναι ένα από τα σπουδαιότερα δομικά υλικά της φύσης και παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στα βιολογικά συστήματα. Η ικανότητά τους να απορροφούν φως, διευκολύνει την διαδικασία της οξειδοαναγωγής και την λειτουργία τους ως μεταφορείς ενέργειας και ηλεκτρονίων. Το εκτενές συζυγιακό π σύστημα των πορφυρινών είναι κατάλληλο για την εφαρμογή τους ως δότες ηλεκτρονίων σε διαδικασίες φωτοεπαγώμενης μεταφοράς ηλεκτρονίων. Οι πορφυρίνες και τα παράγωγά τους έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως φωτοευαισθητοποιητές στην ανίχνευση και αντιμετώπιση καρκινικών όγκων^{19,41} λόγω της χημικής σταθερότητάς τους και της απορρόφησής τους στην ορατή περιοχή.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν ως φθορίζουσες ουσίες για τον εντοπισμό των καρκινικών όγκων, αλλά κατόπιν η χρήση τους, ειδικά τα πρώτα χρόνια της δεκαετίας του '90, γενικεύτηκε σε όλες τις εφαρμογές της PDT (εργαστηριακές και κλινικές). Οι ουσίες αυτές έχουν κύριο μήκος κύματος ενεργοποίησης περίπου στα 630nm. Ο μηχανισμός δράσης τους πιθανολογείται ότι είναι μέσω της παραγωγής οξυγόνου απλής κατάστασης, το οποίο παράγεται, μετά από τη φωτοδιέγερσή τους, από την τριπλή διεγερμένη κατάσταση τους. Τα παράγωγα της αιματοπορφυρίνης (HpD), γνωστά με την εμπορική ονομασία Photofrin I και της διαιματοπορφυρίνης (DHE), γνωστά ως Photofrin II είναι οι πιο διαδεδομένοι φωτοευαισθητοποιητές στην εξωγενή,^{19,42,43} ενώ η πρωτοπορφυρίνη IX στην ενδογενή PDT.⁴⁰

Η πρωτοπορφυρίνη ΙΧ (PPIX) είναι μία πορφυρίνη, η οποία συναντάται σε όλα τα κύτταρα σε μικρές ποσότητες ως τελικό ενδιάμεσο στη βιοσυνθετική οδό της αίμης (εικόνα 3). Η τετραπυρρολική δομή της, της επιτρέπει να συμπλέκεται χηλικά με μέταλλα μετάπτωσης προς τον σχηματισμό μεταλλοπορφυρίνων, οι οποίες εκτελούν ποικίλες βιολογικές λειτουργίες. Το πιο διαδεδομένο σύμπλοκο είναι αυτό της πρωτοπορφυρίνης ΙΧ με το σίδηρο και αποτελεί την αίμη, ένα συστατικό των αιμοπρωτεϊνών που παίζει κρίσιμο ρόλο στην μεταφορά οξυγόνου, σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, στη μεταφορά ηλεκτρονίων κατά την αναπνευστική αλυσίδα κ.α. Τα μόρια της ΡΡΙΧ στα κύτταρα συμμετέχουν ως επι τον πλείστον στη σύνθεση της αίμης και μετατρέπονται αποτελεσματικά σε αυτή με τη βοήθεια του ενζύμου φεροχηλατάση (FECH), του τελικού ενζύμου στη βιοσυνθετική οδό της αίμης. Έτσι, τα επίπεδα της PPIX παραμένουν χαμηλά υπό φυσιολογικές συνθήκες. Κληρονομικές και επίκτητες ασθένειες μπορούν να διαταράξουν τη σύνθεση της αίμης και τους μηχανισμούς ομοιόστασης της ΡΡΙΧ, προκαλώντας συσσώρευση της τελευταίας σε ποσότητες που είναι επαρκείς για να παράγουν φωτοευαισθησία του δέρματος και ηπατική βλάβη.45-50



Εικόνα 3. Η δομή της πρωτοπορφυρίνης ΙΧ (ΡΡΙΧ).

Η προκαλούμενη αυτή φωτοευαισθησία έδωσε το έναυσμα στη μελέτη και τελικά στην κλινική εφαρμογή της PPIX ως φωτοευαισθητοποιητή σε φωτοδυναμική ανίχνευση και θεραπεία (PDT) του καρκίνου.^{37,41} Έχει αποδειχθεί, ότι επαρκής ποσότητα PPIX μπορεί να συντεθεί από εξωγενή χορήγηση 5αμινολεβουλινικού οξέος (ALA) και να δράσει ως φωτοευαισθητοποιητής μετά από έκθεση στο φως, τόσο in vitro όσο και in vivo.41,48 Η ενδογενής PDT περιλαμβάνει την χορήγηση ALA, ενός φυσικώς απαντώμενου ενδιάμεσου στην βιοσυνθετική οδό της αίμης και πρόδρομου της PPIX. Το τελευταίο βήμα στην αλυσίδα αυτήν περιλαμβάνει τη μη πλήρη μετατροπή της PPIX σε αίμη. Εξωτερική χορήγηση του ALA σε βιολογικούς ιστούς, μπορεί να οδηγήσει σε γρήγορο μεταβολισμό του σε PPIX, που συσσωρεύεται στους ιστούς, λόγω αδυναμίας ολικής μετατροπής σε αίμη, με επακόλουθο την ενδογενή φωτοευαισθητοποίηση. Επιπλέον, εχει αποδειχθεί, ότι τα καρκινικά κύτταρα συσσωρεύουν μεγαλύτερη ποσότητα PPIX από τα φυσιολογικά κύτταρα, όταν υποστούν θεραπεία με ALA.^{49,52} Η παροδική εκλεκτικότητα αυτών και η υψηλότερη πρόσληψη του ALA στους νεοπλαστικούς ιστούς, πιθανότατα είναι αποτέλεσμα της αυξημένης αγγειακής διαπερατότητας των όγκων, των διαρθρωτικών αγγειακών ιδιαιτεροτήτων τους, όπως τρύπες στην ενδοθηλιακή εσωτερική μεμβράνη, ασυνέχειες στη βασική μεμβράνη και της αυξημένης συγκέντρωσης των διαλυμένων ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους, όπως ελεύθερα αμινοξέα στο μεσοκυττάριο χώρο του όγκου σε σχέση με το

πλάσμα.⁵⁰⁻⁵⁴ Έτσι, η εμφάνιση φθορισμού σε όγκους είναι κυρίως το αποτέλεσμα μιας ταχύτερης ανταλλαγής ALA από το πλάσμα στον μεσοκυτταρικό χώρο και κατά συνέπεια ταχύτερης πρόσληψης από τα κύτταρα του όγκου από ότι τα φυσιολογικά. Η φωτο-ενεργοποίηση της PPIX σε καρκινικά κύτταρα δημιουργεί ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS), τα οποία μπορεί να προκαλέσουν αποπτωτικό θάνατο, προκλυόμενο από την καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης και των μιτοχονδριακών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών και λιπιδίων, καθώς και του DNA.⁵²⁻⁵⁷ Ακόμη, μπορεί να προκληθούν βλάβες στα αιμοφόρα αγγεία, που οδηγούν σε αγγειακή απόφραξη, η οποία οδηγεί στην έλλειψη οξυγόνου και των θρεπτικών ουσιών που απαιτούνται για την ανάπτυξη του όγκου.³¹ Η φωτοδυναμική επίδραση της PPIX έχει χρησιμοποιηθεί τόσο στη διάγνωση όσο και στη θεραπεία του καρκίνου, δεδομένου ότι η ΡΡΙΧ εκπέμπει κόκκινο φθορισμό όταν ακτινοβολείται με φως μήκους κύματος από 400-410 nm, επάγοντας καρκινικές βλάβες και καταστροφή των καρκινικών ιστών που έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις σε PPIX.55 O βαθμός κυτταροτοξικότητας της PPIX εξαρτάται από το μήκος κύματος του φωτός έκθεσης, λόγω του γεγονότος ότι το βάθος διείσδυσης του φωτός στον ιστό είναι έντονα εξαρτώμενο από το μήκος κύματος της πηγής.³⁰ Εν κατακλείδι, οι περισσότερες έρευνες στο πεδίο έχουν επικεντρωθεί στην επιλεκτική συσσώρευση της PPIX στον όγκο για την αντιμετώπιση της κακοήθειας με τη βοήθεια της φωτοδυναμικής θεραπείας, ενώ άλλες έχουν χρησιμοποιήσει την ανίχνευση φθορισμού της PPIX ως εργαλείο για τη διάγνωση ασθενειών.²⁸

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

3.1 Λειτουργία των μιτοχονδρίων.

Τα μιτοχόνδρια είναι μικρά οργανίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων και αποτελούν το 18-20% του συνολικού κυτταροπλασματικού όγκου τους. Εμφανίζονται σε μεγάλη περιεκτικότητα σε κύτταρα με υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια (μυϊκά κύτταρα, νευρικά κύτταρα, κύτταρα των αισθητηρίων οργάνων, ωάρια, κ.λπ.).

Τα μιτοχόνδρια λειτουργούν ως "εργοστάσια ενέργειας" για το κύτταρο. Ο ρόλος των μιτοχονδρίων είναι η εξασφάλιση της ενέργειας μέσω του μεταβολισμού των βιολογικών μακρομορίων που προσλαμβάνουν οι οργανισμοί με την τροφή τους. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται οξειδωτική φωσφορυλίωση και συντελείται διαμέσου ενός πολύπλοκου διαμεμβρανικού ενζύμου που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και ονομάζεται ΑΤΡ-συνθετάση.⁵⁹ Συγκεκριμένα, η διαδικασία έχει ως εξής (εικόνα 4): στην μήτρα των μιτοχονδρίων το σύνολο των αντιδράσεων, γνωστό ως κύκλος του κιτρικού οξέος ή κύκλος του Κρεμπς παράγει άμεσο ενεργειακό κέρδος 1 μόριο ΑΤΡ και έμμεσο, 3 μόρια NADH και 1 μόριο FADH2. Οι NADH και FADH2 χρησιμοποιούνται στη συνέχεια από τα ένζυμα που έχουν ενσωματωθεί στη μιτοχονδριακή εσωτερική μεμβράνη για τη μεταφορά των υψηλής ενέργειας ηλεκτρονίων στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, ώστε να πραγματοποιηθεί ηοξειδωτική φωσφορυλίωση. Ειδικότερα, η χημειώσμωση ή αλλιώς αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη, καθώς και στον διαμεμβρανικό χώρο. Στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων βρίσκονται 3 μεταφορείς των ηλεκτρονίων, που μεταβιβάζουν e⁻ από τα NADH και FADH2. Οι μεταφορείς αποτελούνται από 3 βασικά ενζυμικά σύμπλοκα, εμφυτευμένα στην εσωτερική μεμβράνη: Το πρώτο ονομάζεται ΝΑDΗαφυδρογονάση και περιέχει την προσθετική ομάδα FMN. Τα e⁻ αρχικά μεταβιβάζονται στην FMN και ύστερα σε μια χημική ένωση, την ουμπικινόνη (κινητός φορέας), η οποία με την σειρά της τα μεταφέρει στο δεύτερο σύμπλοκο,
την κυτταροχρωμική αναγωγάση, που περιέχει το κυτταρόχρωμα b. Έπειτα, τα e παραλαμβάνονται από το κυτταρόχρωμα c και μεταφέρονται στο τρίτο σύμπλοκο, την κυτταροχρωμική οξειδάση, που περιέχει το κυτταρόχρωμα a. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης και ονομάζεται αναπνευστική αλυσίδα. Έπειτα, το NADH, που βρίσκεται στη μήτρα, οξειδώνεται και χάνει το υδρογόνο του, με αποτέλεσμα δύο ηλεκτρόνια να μεταφέρονται στην κυτταροχρωμική οξειδάση, ενεργοποιώντας έτσι τα σύμπλοκα να δράσουν ως αντλίες πρωτονίων. Η άντληση αυτή, σε συνδυασμό με την εκλεκτική διαπερατότητα της μεμβράνης στα πρωτόνια, δημιουργεί διαφορά ηλεκτροχημικού δυναμικού, που μπορεί να εκτονωθεί μόνο από ειδικές πρωτεϊνικές πύλες, όπως είναι ησυνθάση του ΑΤΡ. Αυτό το μεγάλο διαμεμβρανικό ένζυμο δημιουργεί μια υδρόφιλη δίοδο στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (χαμηλότερης συγκέντρωσης) από την οποία περνούν τα πρωτόνια. Καθώς τα πρωτόνια διατρέχουν το ένζυμο, χρησιμοποιούνται για να προωθήσουν τη μη ενεργειακά ευνοούμενη αντίδραση μεταξύ ADP και φωσφορικής ομάδας για τη σύνθεση της ΑΤΡ (οξειδωτική φωσφορυλίωσημε χημειωσμωτικό μηχανισμό). Η ενέργεια που περιέχεται στους δεσμούς της είναι αυτή που την καθιστά το κύριο ενεργειακό νόμισμα του κυττάρου. Η διάσπαση του δεσμού υψηλής ενέργειας μεταξύ της δεύτερης και της τρίτης φωσφορικής ομάδας παρέχει την ενέργεια για να πραγματοποιηθεί σχεδόν κάθε αντίδραση του κυττάρου, που δεν είναι ενεργειακά ευνοούμενη. Τέλος, τα πρωτόνια επανέρχονται στη μήτρα και αφού δεσμευτούν από το Ο2 συντελούν στο σχηματισμό νερού. Τα ηλεκτρόνια που δεν ολοκληρώνουν την αναπνευστική αλυσίδα αντιδρούν άμεσα με το Ο2 προς σχηματισμό της ελεύθερης ρίζας του υπεροξειδίου, ένα δραστικό μόριο που έχει ενοχοποιηθεί για μεγάλο αριθμό ασθενειών, όπως ο καρκίνος, μέσω της οξειδωτικής βλάβης που προκαλεί στα κύτταρα.



Εικόνα 4. Τελική οξείδωση – σύστημα μεταφοράς e – χημειώσμωση. Σύμπλοκο I: NADHαφυδρογονάση με FMN. Σύμπλοκο II: Κυτταροχρωμική αναγωγάση με κυτταρόχρωμα b. Σύμπλοκο III: Κυτταροχρωμική οξειδάση με κυτταρόχρωμα a. Q: Ουμπικινόνη. C: Κυτταρόχρωμα c.

Το μέταλλο που διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στο μιτοχονδριακό μεταβολισμό είιναι ο σίδηρος. Εκτός των άλλων, παίζει ουσιαστικό ρόλο στην παραγωγή ΑΤΡ και την δέσμευση των παραγόμενων δραστικών ειδών οξυγόνου. Συγκεκριμένα, το σύμπλοκο Fe-πρωτοπορφυρίνη (αίμη), τα συμπλέγματα Fe-S και ο Cu είναι απαραίτητα συστατικά των μιτοχονδριακών συγκροτήματων της εσωτερικής μεμβράνης και των συμπλόκων Ι, ΙΙ, ΙΙΙ και ΙV που συμμετέχουν στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Σημαντικότερες λειτουργίες του Fe είναι:⁴²

Η παραγωγή της αίμης: Το τελευταίο βήμα της βιοσύνθεσης της αίμης, η εισαγωγή του δισθενούς σιδήρου στο τετραπυρρολικό δακτύλιο πρωτοπορφυρίνης ΙΧ, λαμβάνει χώρα στο εσωτερικό της μιτοχονδριακής μήτρας. Η αίμη παίζει κρίσιμο ρόλο σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, όπως η μεταφορά ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα, και μπορεί να καταλύσει την παραγωγή των δραστικών ειδών οξυγόνου λόγω του Fe.

Η ενσωμάτωσή του στη μιτοχονδριακή φεριτίνη: Ο σίδηρος δεσμεύεται κυρίως από την φεριτίνη (FTMT) με την μορφή Fe⁺². Ο ρόλος της φεριτίνης είναι η αποθήκευση του Fe⁺² ανάλογα με τις ανάγκες του μιτοχονδρίου, λόγω της τοξικότητας που εμφανίζει, η οποία μπορεί να προκαλέσει οξειδωτική βλάβη στο μιτοχόνδριο. Γι αυτό το λόγο, υπάρχει επιπλέον η ομοιόσταση, που ρυθμίζει την συγκέντρωση του Fe εκτός και εντός μιτοχονδρίου.

Συμπερασματικά, η παρουσία του Fe στις διάφορες μιτοχονδριακές λειτουργίες είναι αναντικατάστατη. Μεταβολές στη συγκέντρωσή του και κατ'επέκταση στην συγκέντρωση της ελεύθερης πρωτοπορφυρίνης ΙΧ ενισχύουν την δράση των ενεργών μορφών οξυγόνου, την καταστροφή του κυττάρου και την εμφάνιση μιτοχονδριακών ασθενειών.

3.2 Παράγοντες εμφάνισης μιτοχονδριακών ασθενειών

Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στην τροφοδοσία των κυττάρων μέσω της παραγωγής ΑΤΡ. Μεταλλάξεις που λαμβάνουν χώρα στο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA), όπως και μεταβολές στις μιτοχονδριακές λειτουργίες ενός οργάνου, ή πολλαπλών συστημάτων οργάνων, εμπλέκονται στην εμφάνιση πληθώρας νοσημάτων, όπως ο καρκίνος, οι καρδιοπάθειες, ο διαβήτης, ο αυτισμός, τα αυτοάνοσα νοσήματα και οι διαδικασίες γήρανσης.⁶¹⁻⁶³

Τα τελευταία 10 χρόνια η δυνατότητα μέτρησης των ενδιάμεσων χημικών ενώσεων (μεταβολιτών) στον κύκλο του Κρέμπς, μέσα από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, αποδεικνύει την σχέση μεταξύ διαταραχών που προκύπτουν σε αυτό το επίπεδο και την εμφάνιση νοσημάτων, όπως ο καρκίνος. Έχει αποδειχθεί, ότι διαταραχές στα ενδιάμεσα στάδια του κύκλου του Κρέμπς συνδέονται άμεσα με την καρκινογένεση. Για να διεκπεραιωθεί το κάθε βήμα του κύκλου παραγωγής ενέργειας είναι απαραίτητα πολύ συγκεκριμένα συστατικά. Αυτά τα συστατικά απαιτούνται για την ενεργοποίηση των ενζύμων που διεκπεραιώνουν την κάθε χημική αντίδραση. Ανάλογα με το κάθε σημείο του κύκλου, τα απαραίτητα μικροθρεπτικά συστατικά μπορεί να

είναι η βιταμίνη B1, η B3, η B5, το συνένζυμο Q10, το μαγνήσιο, αμινοξέα, όπως η γλουταμίνη, αντιοξειδωτικά, όπως η γλουταθειόνη και το α-λιποϊκό οξύ, ο σίδηρος κ.ά.²⁴ Ενδιάμεσοι μεταβολίτες από τον κύκλο του Κρέμπς συσσωρεύονται, εφόσον δεν μπορούν να μεταβολιστούν, και διαχέονται στο εσωτερικό του κυττάρου. Η αυξημένη παρουσία αυτών των μεταβολιτών δημιουργεί ένα περιβάλλον ψευδο-υποξίας μέσα στο κύτταρο, όπως όταν υπάρχει έλλειψη οξυγόνου, και οξείδωσης, που καταλήγουν στην μετατροπή του κυττάρου σε καρκινικό. Κάτω από αυτές τις συνθήκες τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν δυσλειτουργία στον κύκλο του Κρέμπς και μπορούν να μεταβολίσουν γλυκόζη παράγοντας μόνο 1 μόριο ΑΤΡ. Αυτός είναι και ο λόγος που για να επιβιώσουν καταναλώνουν τεράστιες ποσότητες γλυκόζης σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια θεωρούνται η κύρια πηγή δημιουργίας ενεργών μορφών οξυγόνου και αζώτου (ROS, RNS) ρυθμιστικούς ρόλους που παίζουν στο κυτταρικό θάνατο και πολλαπλασιασμό.²⁴ Συγκεκριμένα, διαταραχές στην κανονική κατάσταση οξειδοαναγωγής των κυττάρων μπορεί να προκαλέσουν τοξικές επιδράσεις μέσω της παραγωγής υπεροξειδίων και ελεύθερων ριζών, που βλάπτουν όλα τα συστατικά του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA. Το οξειδωτικό στρες, προερχόμενο από τον οξειδωτικό μεταβολισμό, μπορεί να προκαλέσει αντικατάσταση βάσης, καθώς και σπασίματα σε σημειακές αλληλουχίες του DNA. Η κύρια βλάβη προκαλείται από τις ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) που παράγονται, π.χ. Ο2 (ρίζα υπεροξειδίου), OH (ρίζα υδροξυλίου) και H₂O₂ (υπεροξείδιο του υδρογόνου). Περαιτέρω, μερικά οξειδωτικά είδη δρουν ως κυτταρικοί αγγελιοφόροι στη σηματοδότηση οξειδοαναγωγής. Έτσι, το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει διαταραχές στους φυσιολογικούς μηχανισμούς της κυτταρικής σηματοδότησης. Τέλος, διαταραχές στους μηχανισμούς ομοιόστασης του Fe, της πρωτοπορφυρίνης ΙΧ και στα στάδια της βιοσυνθετικής πορείας της αίμης επιφέρουν την εμφάνιση μιτοχονδριακών ασθενειών.⁴² Ειδικότερα, αύξηση της συγκέντρωσης σιδήρου στην εσωτερική μεμβράνη έχει ως αποτέλεσμα, εκτός των άλλων, τη μείωση της παραγωγή αίμης στην μήτρα, την αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτοπορφυρίνης ΙΧ, την συμπλοκή της τελευταίας με Ζη, την αντίδραση του Fe με ROS και μιας σειράς αντιδράσεων που επιφέρουν τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων.

3.3 Μιτοτροπικές ενώσεις ως θεραπευτική προσέγγιση

Δεδομένου ότι οι μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες μπορεί να επηρεάζουν διαφορετικά όργανα και ιστούς του σώματος, οι ασθένειες που προκαλούν έχουν διαφορετικά συμπτώματα και η θεραπεία τους καθίσταται δύσκολο εγχείρημα. Δεν υπάρχουν συγκεκριμένες θεραπείες για την καταπολέμηση των μιτοχονδριακών ασθενειών, ενώ η υπάρχουσα κοινή θεραπεία τείνει να βοηθήσει στη μείωση των συμπτωμάτων. Αυτή περιλαμβάνει την λήψη αντιοξειδωτικών και σκευασμάτων, όπως το συνένζυμο Q10, βιταμίνες του συμπλέγματος Β (Β1, Β2, Β5, Β9), βιταμίνες C και Ε, που συμμετέχουν ως συμπαράγοντες σε πολλαπλές μεταβολικές διεργασίες, L-καρνιτίνης, Lαργινίνης, κρεατίνης κ.α. Παρόλο που αυτή η θεραπεία στοχεύει στη μείωση της υπερβολικής παραγωγής των ROS, του ρυθμού κυτταρικής διαίρεσης και κατ' επέκταση της οξειδωτικής βλάβης του μιτοχονδριακού DNA,²⁴ τελικά μόνο ένα μικρό μέρος τους επιτυγχάνει να εισέλθει στα μιτοχόνδρια. Μια ακόμη υποστηρικτική προσέγγιση για τις μιτοχονδριακές ασθένειες, μπορεί να θεωρηθεί η συνδυαστική θεραπεία βλαστικών κυττάρων και γονιδίων. Αυτή συμπεριλαμβάνει μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων μέσω της αφαίρεσης ενός κυττάρου, της διόρθωση των μεταλλάξεων μέσα σε αυτό και της εκ νέου εισαγωγής του προκύπτοντος υγιούς γενετικά κυττάρου στον ασθενή.

Τα τελευταία χρόνια αντικείμενο ερευνών για την αντιμετώπιση αυτών των ασθενειών αποτελεί η στοχευμένη κατεύθυνση βιοδραστικών ενώσεων στα μιτοχόνδρια με σύζευξη τους σε λιπόφιλα κατιόντα,^{58-62,68} όπως τα τριφαινυλοφώσφινο κατιόντα. Έρευνες που έχουν πραγματοποιηθείυποδεικνύουν την επιτυχή είσοδο ουδέτερων ενώσεων και ανιχνευτών στο μιτοχόνδριο, γεγονός που θα μπορούσε να αποτελέσει βασικό εργαλείο για την ανάπτυξη της γονιδιακής θεραπείας για τις μιτοχονδριακές ασθένειες του DNA.

Μελέτες που έχουν γίνει *in vivo* και *in vitro*, έχουν καταλήξει στα εξής συμπεράσματα:^{62,63,71}

- ασθενή λιπόφιλα οξέα με pK_a~5 εισέρχονται σε μεγάλο ποσοστό και διανέμονται στο εσωτερικό της μεμβράνης.
- τα TPP κατιόντα έχουν την ιδιαίτερη ιδιότητα να είναι σχετικώς λιποδιαλυτά, παρά το καθαρό θετικό φορτίο τους.
- τα λιπόφιλα TPP κατιόντα συζευμένα με ασθενή λιπόφιλα οξέα εμφανίζουν μεγαλύτερη απόκριση απ' ότι ένα TPP κατιόν.

3.4 Τριφαινυλοφώσφινο παράγωγα ως μιτοτροπικές ενώσεις.

Τα κύρια χαρακτηριστικά των λιπόφιλων TPP κατιόντων είναι:

Η άμεση είσοδός τους, μέσω της φωσφολιπιδικής διπλοστιβάδας, εντός του μιτοχονδρίου, χωρίς να απαιτείται ειδικός μηχανισμός πρόσληψης ή πρωτεΐνη-μεταφορέας. Δηλαδή, η ενέργεια ενεργοποίησης που απαιτείται για τη μετακίνησή τους διαμέσου του ενεργειακού φραγμού μίας βιολογικής μεμβράνης είναι πολύ χαμηλότερη σε σύγκριση με άλλα λιπόφιλα κατιόντα. Η ενέργεια ενεργοποίησης για τη μεταφορά δίνεται από την ενέργεια που απαιτείται για του απαιτείται για τη ενέργεια ενεργοποίησης τους διαμέσου του ενεργειακού φραγμού μίας βιολογικής μεμβράνης είναι πολύ χαμηλότερη σε σύγκριση με άλλα λιπόφιλα κατιόντα. Η ενέργεια ενεργοποίησης για τη μεταφορά δίνεται από την ενέργεια που απαιτείται για να μετακινηθεί το κατιόν από την υδατική φάση στον υδρόφοβο πυρήνα της μεμβράνης, η οποία κυρίως αποτελείται από την ενέργεια Born και την ενέργεια που εκλύεται κατά το φαινόμενο της υδροφοβικότητας. Άυξηση της πρώτης οδηγεί σε μείωση. Η ενέργεια Bohr δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$W_B=\frac{339Z^2}{r}.$$

όπου Ζ το φορτίο του ιόντος και η ιοντική ακτίνα.

Κατ'επέκταση, η ενθαλπία που απαιτείται για την μετακίνηση του κατιόντος εντός της μεμβράνης είναι αντιστρόφως ανάλογη της ακτίνας του, οπότε αύξηση του r ισοδυναμεί με ευνοϊκότερη μετακίνηση.

Όσον αφορά την ελκτική ενέργεια που σχετίζεται με το φαινόμενο της υδροφοβικότητας, δηλαδή την ενέργεια που απαιτείται για μετακίνηση ενός μη

φορτισμένου μόριου από το υδατικό περιβάλλον μέσα στη μήτρα της μεμβράνης, όσο μεγαλύτερη είναι η υδρόφοβη επιφάνεια του κατιόντος, τόσο μεγαλύτερο είναι το φαινόμενο υδροφοβικότητας. Έτσι, η μεγάλη υδρόφοβη ακτίνα του κατιόντος TPP (περίπου 4,2Å) του επιτρέπει να περάσει εύκολα μέσα από τη διπλοστοιβάδα σε σχέση με άλλα κατιόντα. Επιπλέον, αυξάνοντας περαιτέρω την υδροφοβικότητα του κατιόντος θα πρέπει να αυξηθεί το ποσοστό της πρόσληψης του μέσω των βιολογικών μεμβρανών. Αυτή η διαπίστωση οδήγησε στον σχεδιασμό TPP κατιόντων με λιπόφιλα ασθενή οξέα. Το συνολικό ενεργειακό προφίλ κίνησης των συζευγμένων TPP κατιόντων με λιπόφιλα οξέα μέσα από την φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα φαίνεται στη παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 5. Η πρόσληψη λιποφιλικών κατιόντων μέσω της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Αρχικά, τα ΤΡΡ κατιόντα θα δεθούν ισχυρά στο εξωτερικό της μεμβράνης, λόγω ενεργειακού ελάχιστου, κατόπιν θα περάσουν μέσω του δυναμικού ενέργειας στο εσωτερικό, όπου και θα προσροφηθούν.

Εκτός του ενεργειακού φράγματος στο κέντρο, υπάρχουν επιπλέον ενεργειακά φράγματα κοντά στις δύο επιφάνειες της μεμβράνης, η ύπαρξη των οποίων οφείλεται στην ελκτική δύναμη λόγω του φαινομένου της υδροφοβικότητας. Ειδικότερα, αυτή αυξάνεται καθώς προχωράμε κοντά στην επιφάνεια της μεμβράνης, όπου οι απωστικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις αυξάνονται σταδιακά κατά τον ίδιο τρόπο. Ο σχηματισμός «δεσμού» μεταξύ των TPP ιόντων και των ιόντων της μεμβράνης οδηγείται από την μεγάλη αύξηση της εντροπίας λόγω

της υδροφοβικότητας, που υπερνικά την θετική τιμή της ενθαλπίας λόγω των ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Τελικά, ο «δεσμός» μεταξύ των ιόντων λαμβάνει χώρα στη λιπόφιλη πλευρά της διπλοστοιβάδας.

Η μετακίνηση τους στο εσωτερικό της μήτρας επιτυγχάνεται λόγω της μεγάλης διαφοράς δυναμικού της μεμβράνης Δψ. Συγκεκριμένα, μετακίνησή τους από τον εξωμεμβρανικό χώρο, που έχει θετικό δυναμικό, στον εσωτερικό,που έχει υψηλό αρνητικό δυναμικό (150-170 mV) δημιουργεί μία ηλεκτροχημική διαφορά δυναμικού λόγω της ανάγκης εξισορρόπισης των διαφορετικών συγκεντρώσεων των δυο χώρων. Το δυναμικό αυτό Δψm και η αναλογία των συγκεντρώσεων των ελεύθερων, μη δεσμευμένων κατιόντων στα δύο διαμερίσματα περιγράφεται από την εξίσωση Nernst (εικόνα 6).



Εικόνα 6. Μιτοχονδριακή πρόσληψη λιπόφιλων TPP κατιόντων συζευγμένο με μια αφόρτιστη ομάδα (Χ). Η πρόσληψη οδηγείται απο το Δψm και η έκταση της πρόσληψης δίνεται από την εξίσωση Nernst.

Το ΔpH και η pKa του οξέος αποτελούν κινητήρια δύναμη για την μεταφορά ενός TPP κατιόντος λιπόφιλου οξέος στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου. Ειδικότερα, τα εν λόγω οξέα με pKa~5 βρίσκονται σε ισορροπία με την αμφοτερική τους μορφή σε pH~7.2 στο κυτοσόλιο. Όταν το ΔpH είναι θετικό, η μεταφορά τους στο εσωτερικό της μεμβράνης του μιτοχονδρίου γίνεται

αυθόρμητα. Εδώ, το ΔpΗ είναι θετικό (pΗμήτρας-pΗκυτοσολίου=8.0 -7.2= 0.8) και τελικά ύστερα από την εξισορρόπηση του pΗ στους δύο χώρους, τα υδρόφοβα οξέα απορροφώνται στη μήτρα του μιτοχονδρίου.

Εν κατακλείδι, οι ενώσεις που περιλαμβάνουν ένα TPP κατιόν ενωμένο με μια λιπόφιλη αλκυλο ομάδα, που περιέχει ένα καρβοξυλικό οξύ, όπως το TPP-C₁₀H₂₁COOH και αντίστοιχα παράγωγά του, μπορούν να αποτελέσουν ενώσειςστόχοι σημαντικής βιολογικής σημασίας για την στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου του μιτοχονδριακού DNA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΛΟΥΜΙΝΟΛΗ

4.1 Ιστορική αναδρομή

Η λουμινόλη πρωτοσυντέθηκε το 1908 από τον Γερμανό χημικό A.Schmitz,^{73,76} όμως η χημειοφωταύγειά της αναφέρθηκε το 1928 από τον H.O.Albrecht,⁷² ο οποίος διαπίστωσε ότι το αίμα, μεταξύ άλλων ουσιών, ενίσχυε τη φωταύγεια της λουμινόλης σε ένα αλκαλικό διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου, όπως επιβεβαίωσαν και οι Karl Gleu και Karl Pfannstiel το 1936. Η ιστορική στιγμή για την ένταξη της λουμινόλης στην εγκληματολογία ήρθε το 1937, όταν η Γερμανίδα επιστήμονας Walter Specht⁷⁸ ξεκίνησε εκτεταμένες μελέτες σχετικά με τη χημειοφωταύγεια της λουμινόλης παρουσία αιμίνης (σύμπλοκο του σιδήρου προερχόμενο από την αίμη). Ακολούθησαν οι Proesher και Moodyπου διερεύνησαν τη χημική δομή και τις ιδιότητες της λουμινόλης και προέβλεψαν σωστά την κετο-ενολική ταυτομερείωση της λουμινόλης σε αλκαλικό διαλύμα και την πλήρως πρωτονιωμένη μορφή της σε όξινο διάλυμα.⁸⁰ Το 1951 ο Grodsky και η ερευνητική του ομάδα πρότειναν ένα μείγμα από λουμινόλη, ανθρακικό νάτριο (Na₂CO₃) και υπερβορικό νάτριο (NaBO₃·nH₂O) με αποσταγμένο νερό, το οποίο χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα από τους ερευνητές για την ανίχνευση κηλίδων αίματος.⁷⁷ Στη δεκαετία του '80 ο Merenyi και οι συνεργάτες του⁷⁹ μελέτησαν την κινητική και то μηχανισμό της αντίδρασης χημειοφωταύγειας, ενώ η χημεία της λουμινόλης από εγκληματολογική σκοπιά έχει συνοψιστεί από τους Thornton και Malony.⁷⁶ Τα τελευταία 20 χρόνια, η λουμινόλη και τα παράγωγά της χρησιμοποιούνται εκτενώς σε αναλυτικές, βιοχημικές και ιατροδικαστικές εφαρμογές και έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για τη βελτίωση της χημείας της. Πολλές από αυτές βασίζονται στη μεγιστοποίηση της έντασης χημειοφωταύγειας, καθιστώντας φόρμουλες λιγότερο καταστροφικές για το DNA, με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και παρατείνοντας τη διάρκεια της αντίδρασης.^{73,75} Εχει χρησιμοποιηθεί ως βάση για ευαίσθητες και επιλεκτικές μεθόδους ανίχνευσης, συμπεριλαμβανομένων της υψηλής απόδοσης υγρής χρωματογραφίας (HPLC), της ανοσοδοκιμασίας, των ανιχνευτών και της δακτυλογράφησης DNA και ως υπόστρωμα στη τεχνική ανίχνευσης WesternBlot.⁸¹⁻⁸⁸Τη λουμινόλη χρησιμοποιούν επίσης πρόσφατες αρχαιολογικές μελέτες, γεγονός που ανοίγει ένα καινοτόμο ερευνητικό πεδίο.^{89,90}

4.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες της λουμινόλης.

Η λουμινόλη (C₈H₇N₃O₂) ή 3-αμινοφθαλυδραζίδιο ή 5-αμινο-2,3διυδροφθαλαζιν-1,4-διόνη (κατά IUPAC) είναι μια κυκλική ακυλυδραζίνη, που πέραν της τυπικής δραστικότητας, που εμφανίζει η κατηγορία αυτών των ενώσεων,⁹¹ εμφανίζει και άλλα αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά.

Ένα χαρακτηριστικό της είναι η φωτοθερμική σταθερότητα και η χημική συμπεριφορά στους πρωτικούς πολικούς διαλύτες. Έχει διαπιστωθεί πως τα διαλύματα λουμινόλης είναι ευαίσθητα στο φως και στη ύπαρξη μεταλλικών ιόντων, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι η σταθερότητά τους διαρκεί μόνο 8-12 ώρες. Όσον αφορά τη θερμική σταθερότητα των διαλυμάτων της, έχει αποδειχθεί πως πρέπει να προστατεύονται από υψηλές θερμοκρασίες.⁹²

Η λουμινόλη θεωρείται ασθενές οξύ, και έχουν παρατηρηθεί δυο τιμές pK_α που αντιστοιχούν σε απώλεια ενός (pK_α = 6.74) ή δυο πρωτονίων (pK_α = 15.1) από αυτήν.^{93.94} Ειδικότερα, σε όξινα υδατικά διαλύματα η λουμινόλη βρίσκεται με την πλήρως πρωτονιωμένη μορφή της (LH₂), ενώ σε βασικά διαλύματα επικρατούν οι μορφές του ανιόντος (LH⁻) και του διανιόντος (L²⁻) της. Επιπλέον, οι μορφές LH₂ και LH⁻εμφανίζουν ταυτομέρεια κετόνης-ενόλης (σχήμα 1).



Σχήμα 1: Ηπρωτονίωση και ο ταυτομερισμός της λουμινόλης σε όξινο (LH₂) και βασικό διάλυμα (LH⁻, L²⁻).

Η λουμινόλη έχει ένα ακόμη ιδιαίτερο χαρακτηριστικό: να εμφανίζει χημειοφωταύγεια με εκπομπή χαρακτηριστικού μπλέ φωτός κάτω από ορισμένες οξειδωτικές συνθήκες. Αυτή η εκπομπή ακτινοβολίας από την οξείδωση της λουμινόλης αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία αρκετών σταδίων και εξαρτάται από παράγοντες όπως ο διαλύτης, το pH, η θερμοκρασία και η φύση των δραστικών ενώσεων που αντιδρούν με την λουμινόλη, δηλαδή του καταλύτη και του οξειδωτικού μέσου.⁸⁸

4.3 Χημειοφωταύγεια

Το φαινόμενο της φωταύγειας είναι το φαινόμενο εκπομπής ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που διαχέεται ως φωτόνια λόγω της αποδιέγερσης των σχηματιζόμενων διεγερμένων μορίων σε μια κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας. Ανάλογα με τον τρόπο που σχηματίζονται τα διεγερμένα μόρια, διακρίνονται διάφορα είδη φωταύγειας: η χημειοφωταύγεια, η φωτοφωταύγεια, η ηλεκτροφωταύγεια, η βιοφωταύγεια κ.α.

Η χημειοφωταύγεια, συγκεκριμένα, είναι το φαινόμενο εκπομπής ακτινοβολίας λόγω της αποδιέγερσης των μορίων που προκύπτουν από χημικές αντιδράσεις.^{88,95}Οι αντιδράσεις χημειοφωταύγειας που λαμβάνουν χώρα σε διαλύματα και παράγουν ως ενδιάμεσο ή τελικό προϊόν φθορίζουσες ενώσεις, αποτελούν τον τομέα της χημειοφωτάγειας υγρής φάσης, που τα τελευταία χρόνια έχει προσελκύσει το μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον. Αυτές οι αντιδράσεις αποτελούν ως επί τον πλείστον οξειδοαναγωγικές διαδικασίες, στις οποίες το ενδιάμεσο προϊόν είναι μια διεγερμένη ένωση με διαφορετική χημική δομή από το αντιδρών, η οποία είτε φωταυγεί (άμεση χημειοφωταύγεια), είτε αντιδρά με ένα άλλο μόριο που προϋπάρχει στο χώρο, το οποίο τελικά ευθύνεται για την εκπομπή φωτός (έμμεση ή ευαισθητοποιημένη χημειοφωταύγεια). Μόλις το μόριο μετατραπεί σε ένα μετασταθές ενδιάμεσο στη διεγερμένη κατάσταση, υπάρχουν μια σειρά από διαδρομές από τις οποίες μπορεί να επιστρέψει στην θεμελιώδη κατάστασή του. Αυτές οι διαδρομές παρουσιάζονται διαγραμματικά από το ενεργειακό διάγραμμα Jablonski (εικόνα 7).



Εικόνα 7. Το ενεργειακό δίαγραμμα Jablonski δείχνει τις ενεργειακές στάθμες και μεταπτώσεις ενός μορίου, όπου So η βασική ενεργειακή κατάσταση του μορίου, S1 η πρώτη και S2 η δεύτερη απλή διεγερμένη, και T1 η πρώτη τριπλή διεγερμένη.

Η εκπομπή φωτός μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω αποδιέγερσης είτε μιας απλής διεγερμένης κατάστασης (φθορισμός), είτε μιας τριπλής κατάστασης (φωσφορισμός). Το φως που εκπέμπεται από τις αντιδράσεις χημειοφωταύγειας διαφέρει στην ένταση, στη διάρκεια ζωής και στο μήκος κύματος, με το τελευταίο να καλύπτει το φάσμα κοντά στην υπεριώδη μέχρι την εγγύς υπέρυθρη περιοχή. Για την εκπομπή ακτινοβολίας μέσω χημικής αντίδρασης θα πρέπει να τηρούνται τρεις προϋποθέσεις:⁷³

- Θα πρέπει να υπάρχει ένα ενεργειακά ευνοϊκό μονοπάτι για την παραγωγή ενώσεων στη διεγερμένη κατάσταση. Δηλαδή, από τον συνολικό αριθμό των μορίων που συμμετέχουν στην αντίδραση, ένας σημαντικός αριθμός θα πρέπει να περιέλθει στην διεγερμένη κατάσταση.
- Η αντίδραση να είναι εξώθερμη, ώστε να ευνοείται, με την ελεύθερη ενέργεια να κυμαίνεται στην περιοχή των 170-300 kJ mol⁻¹.
- 3. Θα πρέπει να υπάρχει ένα ευνοϊκό μονοπάτι αποδιέγερσης για την εκπομπή χημειοφωταύγειας, με άλλες διεργασίες που δεν εκπέμπουν φώς, όπως τα φαινόμενα της ενδο- ή δια-μοριακής μεταφοράς ενέργειας, μοριακής διάστασης, ισομερισμού ή εσωτερικής μετατροπής, να περιορίζονται στο ελάχιστο.

Η ένταση εκπομπής χημειοφωταύγειας εξαρτάται από την ταχύτητα της αντίδρασης και την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας δημιουργίας των διεγερμένων καταστάσεων. Η τελευταία μπορεί να περιγραφεί από τον συντελεστή κβαντικής απόδοσης χημειοφωταύγειας (Φ_{CL}) και ορίζεται ως:

 $\Phi_{CL} = \frac{A \rho \iota \theta \mu ό \varsigma ε \kappa π ε \mu π ό \mu ε ν ων φ ω τ ο ν ί ω ν}{\Sigma υ ν ο λικό ς α ρ ι θ μ ό ς α ν τι δ ρ ών τ ων μο ρ ί ω ν$

Η κβαντική απόδοση και το μήκος κύματος της χημειοφωταύγειας επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από το περιβάλλον που λαμβάνει χώρα η αντίδραση.

Χημειοφωταύγεια της λουμινόλης

Η χημειοφωταύγεια της λουμινόλης ανήκει στις αντιδράσεις χημειοφωταύγειας υγρής φάσης. Ειδικότερα, η λουμινόλη οξειδώνεται σχεδόν ποσοτικά προς τον σχηματισμό του 3-αμινο-φθαλικούιόντος στην διεγερμένη κατάστασή του, που εκπέμπει μπλέ φώς επιστρέφοντας στη θεμελιώδη, σε πρωτικούς ή απρωτικούς πολικούς διαλύτες, παρουσία οξειδωτικών μέσων και καταλύτη (σχήμα 2). Η κβαντική απόδοση της αντίδρασης είναι μικρή (φ~1%) και το φάσμα εκπομπής δείχνει ένα μέγιστο λ_{max} στα 425 nm στο νερό. Τα πιο συνήθη οξειδωτικά μέσα που χρησιμοποιούνται για την αντίδραση αυτή είναι H₂O₂, KMnO₄, KIO₄, NaBrO και K₃[Fe(CN)₆]. Η αντίδραση χημειοφωταύγειας ενεργοποείται μέσα από ένα ευρύ φάσμα καταλυτών, περισσότερο ή λιγότερο εξειδικευμένων, ανάλογα με το συγκεκριμένο είδος οξειδωτικού και με ποικίλες αποδόσεις. Καταλύτες μπορεί να είναι οι: αιμίνη και πρωτεΐνες αίμης, (αιμοσφαιρίνη, υπεροξειδάσες, καταλάση, κυτοχρώματα κ.α.) και το ένζυμο HRP, που συνήθως θεωρούνται ως οι πιο αποτελεσματικοί, δρώντας σε pH~8-11 και έχοντας αρκετά υψηλή εκλεκτικότητα προς το H₂O₂ ως οξειδωτικό μέσο.



Σχήμα 2. Η αντίδραση χημειοφωταύγειας της λουμινόλης.

Κατιόντα μετάλλων μετάπτωσης Mⁿ⁺ (Co²⁺, Cu²⁺, Cr², Fe²⁺, Fe³⁺, Hg²⁺, Mn^{·4+}, Ni²⁺) και συμπλοκοποιημένες μορφές τους (π.χ. φερροκένιο, σιδηροκυανιούχα άλατα) μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως καταλύτες.

Σημαντικό ρόλο στη αντίδραση αυτή παίζει η φύση του διαλύτη. Έχει παρατηρηθεί, ότι σε αλκαλικά διαλύματα μη πρωτικών πολικών διαλυτών (DMSO) η αντίδραση γίνεται μόνο με την παρουσία O₂ (χωρίς την παρουσία άλλου οξειδωτικού μέσου ή καταλύτη), και είναι σχεδόν ποσοτική, δίνοντας αποκλειστικά το 3-αμινοφθαλικό ανιόν. Αντιθέτως, σε υδατικά αλκαλικά διαλύματα είναι απαραίτητη η παρουσία καταλύτη και οξειδωτικού μέσου για την εμφάνιση χημειοφωταύγειας, ενώ τα προϊόντα της αντίδρασης υφίστανται περαιτέρω οξείδωση λόγω της παρουσίας ισχυρών οξειδωτικών μέσων, καθιστώντας δύσκολη την ανίχνευση του 3-αμινοφθαλικού ανιόντος. Επίσης, η κβαντική απόδοση χημειοφωταύγειας ($Φ_{CL}$) και το φάσμα εκπομπής της λουμινόλης σε διμεθυλοσουλφοξείδιο είναι 0,05 και λ ~480-502 nm (πρασινογάλαζο) ενώ σε νερό 0.01 και λ ~425 nm (μπλε-ιώδες πρός μπλε-πράσινο) αντίστοιχα.^{96,97} Τέλος, η φαινόμενη εκπομπή της ακτινοβολίας εξαρτάται από παράγοντες όπως η παρουσία συμπλόκων σιδήρου, τα οποία απορροφούν ισχυρά στα ~420 nm, με αποτέλεσμα το μήκος κύματος της χημειοφωταύγειας να εμφανίζεται μετατοπισμένο στα 455 nm.

4.4 Μηχανισμός χημειοφωταύγειας της λουμινόλης

Ο ακριβής μηχανισμός χημειοφωταύγειας (CL) είναι ακόμη υπό συζήτηση, αν και υπάρχουν μια σειρά από μελέτες που έχουν ρίξει φως σε διάφορες πτυχές της αντίδρασης.¹²³Οσον αφορά την προέλευση της, το γεγονός ότι τα φάσματα CL (σευδατικά διαλύματα ήσε DMSO) συμπίπτουν με τα φάσματα φθορισμού του 3-AP²⁻ (σχήμα 3) υποδεικνύουν τη μονήρη διεγερμένη δομή 3-APH⁻ ως πηγή της αντίδρασης χημειοφωταύγειας.

Ο μηχανισμός χημειοφωταύγειας της λουμινόλης σε υδατικά διαλύματα (με την παρουσία ΝαΟΗ και ενός οξειδωτικού,όπως το K₃[Fe(CN)₆]), έχει διερευνηθεί εκτενώς. Έχει αποδειχθεί ότι η ένταση χημειοφωταύγειας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το pH (συνήθως 8-11) και από τους καταλύτες / οξειδωτικά μέσα που χρησιμοποιούνται κάθε φορά.¹²⁴ Ακόμη, η παρουσία του διανιόντος L2⁻ της λουμινόλης επισημαίνεται ως απαραίτητη, όπως και η παρουσία του οξυγόνου, καθώς έχει βρεθεί ότι απαερωμένα διαλύματα δεν παράγουν CL.¹²⁵ Ο πιο πιθανός μηχανισμός χημειοφωταύγειας της λουμινόλης, όπως προτάθηκε από τον Merenyi και την ερευνητική ομάδα συνοψίζεται στο σχήμα 3.⁹⁴

Η λουμινόλη σε αλκαλικά διαλύματα (pH~8-11) βρίσκεται με την μορφή του μονοανιόντος LH⁻. Παρουσία οξειδωτικού μέσου, πραγματοποιείται οξείδωση

του LH προς σχηματισμό της ρίζας LH, η οποία μπορεί να αντιδράσει με οξυγόνο προς σχηματισμό της δραστικής ρίζας Ο2, που είναι υπεύθυνη για την αναγωγή της λουμινόλης πίσω στη μορφή LH⁻. Η ισορροπία της αντίδρασης τείνει να μετατοπίζεται προς τα δεξιά, διότι η αντίδραση μεταξύ των LH' και O2 είναι αργή, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της ρίζας του οξυγόνου να είναι μικρή για να αντιδράσει περαιτέρω. Στη συνέχεια, η ρίζα LH'αποπρωτονιώνεται στη ανιοντική της μορφή LH'-, η οποία είτε μπορεί να αντιδράσει με την ρίζα Ο2'- προς σχηματισμό του υπεροξειδίου L-OOH, είτε να οξειδωθεί προς σχηματισμό της μη χημειωφωταυγούς αμινοφθαλαζίνης L. Η τελευταία μπορεί να προκύψει και από την αντίδραση οξείδωσης της LH'. Το παραγόμενο L (προερχόμενο από το LH'ή από τοLH') οξειδώνεται προς το L'OOH με βασική προϋπόθεση την ύπαρξη H2O2, γεγονός που εξηγεί την αυξημένη κβαντική απόδοση της CL που έχει παρατηρηθεί κατά την προσθήκη H₂O₂. Η ισορροπία LOOH⁻ ↔ LHOOH φαίνεται να είναι μεγάλης σημασίας για την αντίδραση χημειοφωταύγειας, καθώς όταν τείνει προς το LOOH⁻ οδηγεί στο σχηματισμό διεγερμένου 3-αμινοφθαλικού ανιόντος που εκπέμπει ακτινοβολία TOU μεταβαίνοντας σε χαμηλότερης ενέργειας κατάσταση με ταυτόχρονη απώλεια ενός μορίου N2. Την ίδια στιγμή, όταν επικρατεί το πρωτονιωμένο υπεροξείδιο LHOOH δίνει μια 'σκοτεινή' αντίδραση με απώλεια ενός μορίου O2 προς σχηματισμό λουμινόλης. Βασικός παράγοντας που καθορίζει τη διάσπαση του ενδιαμέσου και κατ' επέκταση την ένταση χημειοφωταύγειας της λουμινόλης είναι η τιμή του pH στο σύστημα. Ειδικότερα, σε χαμηλές τιμές pHευνοείται η πρωτονίωση του ενδιαμέσου LOOH⁻ στην πρωτονιωμένη μορφή LHOOH, ενώ η pKa της ισορροπίας αυτής (≈ 10,5) καθορίζει το βέλτιστο pH της αντίδρασης.^{94,99} Το υπεροξείδιο LOOH⁻ υπόκειται σε απόσπαση αζώτου (μέσω των ενδιάμεσων Lint1-3) προς την τριπλή διεγερμένη κατάσταση του 3-αμινοφθαλικού ανιόντος ^Τ3-ΑΡΗ^{-*}, η οποία, μέσω διασυστηματικής διασταύρωσης, δίνει την απλή διεγερμένη ενεργειακή κατάσταση ^S3-APH^{-*}. Η αποδιέγερση του τελευταίου στη θεμελιώδη κατάσταση συνοδεύεται από εκπομπή φθορισμού στα 424 nm.



Σχήμα 3. Προτεινόμενος μηχανισμός χημειοφωταύγειας της λουμινόλης σε υδατικά διαλύματα.

4.5 Οξειδωτικά μέσα που χρησιμοποιούνται στη χημειοφωταύγεια της λουμινόλης.

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) είναι το πλέον διαδεδομένο οξειδωτικό μέσο χημειοφωταύγειας της λουμινόλης, αλλά απαιτεί την καταλυτική επίδραση μεταλλικού ιόντος ή ενζύμου. Μπορεί να αντιδράσει άμεσα με τη λουμινόλη, διαλυμένη σε υδατικό διάλυμα, παρουσία ιόντωνμετάλλων μετάπτωσης όπως ταCo²⁺, Cu²⁺, Cr²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Hg²⁺, ως καταλύτες. Αυτά

αντιδρούν με το H₂O₂ παράγοντας ρίζες υδροξυλίου (OH^{*}), οι οποίες έχουν αρκετά ισχυρές οξειδωτικές ιδιότητες για να ξεκινήσουν την πρώτη οξείδωση της λουμινόλης. Αυτές οι ρίζες μπορούν ακόμα να αντιδράσουν με το H₂O₂ και τα ιόντα του προς σχηματισμό του υπεροξειδίου O₂^{-*}. Ακόμη, σε υψηλές συγκεντρώσεις H₂O₂, το προϊόν της οξείδωσης της λουμινόλης, L, μετατρέπεται ποσοτικά στο LOOH⁻, ανεξαρτήτωςpH.

- Οι ρίζες του οξυγόνου (O₂^{-*}, OH^{*}) αποτελούν αποτελεσματικά οξειδωτικά μέσα για την χημειοφωταύγεια της λουμινόλης. Παράγονται συνήθως από την οξείδωση του μοριακού οξυγόνου (O₂), με καταλύτες τα μέταλλα μετάπτωσης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η απαέρωση του διαλύματος της λουμινόλης, οδηγεί σε γρηγορότερη οξείδωση του μετάλλου, με αποτέλεσμα οι υψηλές συγκεντρώσεις (>10⁻⁷M) των παραγόμενων ριζών να αντιδρούν γρήγορα (<10⁻⁴s) προς σχηματισμό της ρίζας OH^{*}. Η τελευταία αντιδρά με το ιόν της λουμινόλης (LH⁻) προς σχηματισμό των L και LH^{*}, ενώ παράγεται και το υπεροξειδίου O₂^{-*}. Το τελευταίο αντιδρά με τα προϊόντα της πρώτης οξείδωσης της λουμινόλης προς σχηματισμό του ενδιαμέσου LOOH⁻.
- Επίσης, τα υπερμαγγανικά Mg⁺⁷ και μαγγανικά ιόντα Mg⁺⁵ μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως οξειδωτικά. Ο μηχανισμός οξείδωσης της λουμινόλης από μαγγανικά ιόντα είναι ίδιος με αυτόν από τα οξειδωτικά μέσα που αναφέρθηκαν παραπάνω. Τα ιόντα Mg⁺⁷και Mg⁺⁵ οξειδώνουν τη λουμινόλη παρουσία δισθενών και τρισθενών μετάλλων μετάπτωσης ως καταλύτες προς σχηματισμό του διεγερμένου 3-αμινοφθαλικού ιόντος και ιόντων Mg⁺², με εκπομπή ακτινοβολίας λ_{max}~ 425 nm.

4.6 Χημεία της λουμινόλης.

 Λόγω των πολλαπλών εφαρμογών της λουμινόλης έχουν γίνει προσπάθειες σύνθεσης παραγώγων της προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η Φ_{CL} και να διερυνθεί η περιοχή του φάσματος εκπομπής της (χημειοφωταύγεια). Παρ'όλα αυτά, η χημεία της λουμινόλης είναι αρκετά περιορισμένη, όπως έχει διαπιστωθεί από τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα, ενώ οι περισσότερες συνθετικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί πριν τη δεκαετία του '50, οπου δεν υπήρχε ο σημερινός προηγμένος εργαστηριακός εξοπλισμός προεξέχοντος του NMR.^{72,77,78,97} Γενικά, από προηγούμενες μελέτες και αποτελέσματα, η λουμινόλη έχει 5 πυρηνόφιλα κέντρα. Το πιο προφανές κέντρο είναι η 5-άμινο ομάδα. Επιπλέον, τα πρωτόνια της υδραζίνης είναι αρκετά όξινα, οπότε, παρουσία βάσης (έστω και ασθενούς), η λουμινόλη αποπρωτονιώνεται οδηγώντας στο μονοανιόν, στο οποίο το αρνητικό φορτίο εντοπίζεται στην 2-Ν ή 3-Ν θέση. Έτσι, το μονοανιόν στις δυο αυτές θέσεις μπορεί είτε να αντιδράσει με το πυρηνόφιλο κέντρο, είτε να ισομερειωθεί προς την ενολική του μορφή, σχηματίζοντας το μονοανιόν, όπου το αρνητικό φορτίο εντοπίζεται στην 1-Ο ή 4-Ο θέση. Συνοψίζοντας, η αντίδραση της λουμινόλης με ένα ηλεκτρονιόφιλο παρουσία βάσης μπορεί να αποδώσει 5 ισομερή προϊόντα (σχήμα 4).



Σχήμα 4. Οι πιθανές πορείες της αντίδρασης της λουμινόλης με ηλεκτρονιόφιλο Ε παρουσία βάσης Β.

Σύνθεση της λουμινόλης

Τις τελευταίες δεκαετίες, η σύνθεση νέων ετεροκυκλικών ενώσεων έχει αποτελέσει αντικείμενο μεγάλου ενδιαφέροντος λόγω της ευρείας εφαρμογής τους. Ανάμεσα σε μια μεγάλη ποικιλία από ετεροκυκλικές ενώσεις που περιέχουν τη χαρακτηριστική ομάδα της φθαλαζίνης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η λουμινόλη.⁸⁸⁻⁹¹ Αρχικά, η σύνθεση της λουμινόλης επιτεύχθηκε σε απόδοση μόλις 35% μέσω αντίδρασης υδραζυνόλυσης του 3-νιτροφθαλικού

οξέος σε διαλύτη γλυκόλη υπό επαναρροή και στη συνέχεια αντίδραση αναγωγής από διθειώδες νάτριο.^{127,128} Αργότερα, αυτή η αντίδραση σύνθεσης αντικαταστάθηκε από άλλες μεθόδους που περιλάμβαναν την αναγωγή της πρόδρομης ένωσης 3-νιτροφθαλυδραζίνης είτε από θειούχες ενώσεις αμμωνίου κασσίτερο.^{129,130} 3TÌ3 από χλωριούχο Σήμερα, χρησιμοποιούνται δύο εναλλακτικές συνθετικές πορείες ξεκινώντας από το 3-νιτροφθαλικό οξύ, όπως συνοψίζονται στο σχήμα 5.¹²⁶ Στην πρώτη, το 3-νιτροφθαλικό οξύ υποβάλλεται σε αντίδραση με ουρία σε διαλύτη οξικό οξύ υπό επαναρροή, προς σχηματισμό του 3-νιτροφθαλιμιδίου, το οποίο στη συνέχεια ανάγεται με σκόνη σιδήρου σε υδατικό διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου με θέρμανση ή με καταλυτική υδρογόνωση, χρησιμοποιώντας Pd/C σε αιθανόλη. Τελικά, σχηματίζεται το 3αμινοφθαλιμίδιο, το οποίο με την σειρά του αντιδρά με ένυδρη υδραζίνη σε αιθανόλη υπό αναρροή παράγοντας λουμινόλη. Η δεύτερη συνθετική πορεία περιλαμβάνει την αντίδραση υδραζινόλυσης του 3-νιτροφθαλικού οξέος προς σχηματισμό της 5-νιτρο-2,3-διυδροφθαλαζιν-1,4-διόνης, η οποία δίνει τη λουμινόλη μέσω αναγωγής της νιτρο ομάδας με τις ίδιες συνθήκες.



Σχήμα 5. Συνθετικές πορείες της λουμινόλης. Συνθήκες: (i) ουρία, AcOH, Δ, (ii) Fe/ NH₄Cl/ H₂O, Δ ή H₂, Pd/C, EtOH, (iii) NH₂NH₂ H₂O, EtOH, Δ.

Παράγωγα της λουμινόλης

Διάφορα παράγωγα της λουμινόλης και γενικότερα της φθαλαζινοδιόνης έχουν συντεθεί και μελετηθεί ως προς την εκπομπή χημειοφωταύγειας. Η σύνθεση των παραγώγων της λουμινόλης ξεκινάει ως επί τον πλείστον από πρόδρομα μόρια

της, ενώ οι αναφορές σε αντιδράσεις που συμμετέχει είναι ελάχιστες και χρονολογούνται πριν τη δεκαετία του 50'.

Ο Drew και η ερευνητική του ομάδα καινοτόμησαν στη σύνθεση και την λουμινόλης.^{111,117-119} χημειοφωταύγειας παραγώγων αξιολόγηση των Συγκεκριμένα, έχουν αναφέρει ότι η αρωματική υποκατάσταση του δακτυλίου των παραγώγων της λουμινόλης είτε μπορεί να ενισχύσει την κβαντική απόδοση χημειοφωταύγειας $(\Phi_{CI}),$ зтіз να αδρανοποιήσει τον μηχανισμό χημειοφωταύγειας. Μια πρώτη απόπειρα να συγκριθούν τα διάφορα παράγωγα των φθαλαζινονών σχετικά με τις ιδιότητες CL παρουσιάζεται στο σχήμα 6.



Σχήμα 6. Σύγκριση της χημειοφωταύγειας των παραγώγων της φθαλαζινοδιόνης.

Μερικές γενικές παρατηρήσεις που μπορούν να εξαχθούν είναι:

- Οι ομάδες δότες ηλεκτρονίων στον αρωματικό δακτύλιο αυξάνουν την CL, ενώ το αντίθετο ισχύει για τις ομάδες δέκτες ηλεκτρονίων.
- Η υποκατάσταση στις θέσεις 5- και 8- έχει ισχυρότερη επίδραση σε σύγκριση με αυτή στις θέσεις 6- και 7-.
- Η 5,8-διυποκατάσταση πιθανότατα έχει ισχυρότερη επίδραση από τη μονοϋποκατάσταση.
- Η ένταση CL κάθε ένωσης εξαρτάται από τις συνθήκες οξείδωσης (οξειδωτικό, θερμοκρασία κλπ).
- 5) Το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής αλλάζει ανάλογα με το παράγωγο.
- 6) Η υποκατάσταση της 5-αμινο ομάδας από Η, Me, NO₂ ή Cl, ελαττώνει στο ελάχιστο την ένταση CL.¹⁰⁵

Επιπλέον, oWhite και η ερευνητική του ομάδα^{99,104,106} εξέτασαν παράγωγα της λουμινόλης με υποκατάσταση στον αρωματικό δακτύλιο (σχήμα 7). Μερικά από τα πιο ενδιαφέροντα παραδείγματα υποκατεστημένων 3-αμινοφθαλυδραζιδίων που εμφανίζουν εντονότερη χημειοφωταύγεια από την λουμινόλη είναι ενώσεις, όπου R₂, R₃ = OMe και R₁ = H ή OMe και R₁, R₂ = H και R₃ = Me ή Pr. Αντίθετα, παραδείγματα ενώσεων που εμφανίζουν μειωμένη CL είναι τα παράγωγα λουμινόλης με R₁, R₂= H και R₃ = NH₂, OMe. Οι δομές αυτές θα έπρεπε να παρουσιάζουν χημειοφωταύγεια παρόμοιας ή καλύτερης έντασης σε σχέση με την λουμινόλη (παρατήρηση N°1, σχήμα 6), αλλά τελικά τα αρωματικά τμήματα των ενώσεων αυτών είναι τόσο πλούσια ηλεκτρονιακά, ώστε το οξειδωτικό τείνει να αντιδρά με αυτούς τους δακτύλιους σχηματίζοντας παράγωγα κινόνης. 105,106 Έτσι, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η ηλεκτρονική πυκνότητα στον αρωματικό δακτύλιο της λουμινόλης και στα παράγωγά της παίζει έναν ιδιαίτερο ρόλο στην αντίδραση χημειοφωταύγειας και το φαινόμενο εκπομπής ακτινοβολίας σχετίζεται άμεσα με αυτή. Τέλος, εξετάστηκε η επίδραση του βαθμού υποκατάστασης της άμινο ομάδας της λουμινόλης ως προς την CL και εξήχθη το συμπέρασμα ότι τα μονοϋποκατεστημένα παράγωγα της λουμινόλης εμφανίζουν χαμηλή CL και τα διυποκατεστημένα ακόμα χαμηλότερη.



Σχήμα 7. Υποκατεστημένα παράγωγα της λουμινόλης.

Αντίδραση ακυλίωσης

Κύρια κατηγορία αντιδράσεων παραγωγοποίησης της λουμινόλης είναι η ακυλίωση της άμινο ομάδας της. Από τις μελέτες που έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα, η αντίδραση ακυλίωσης συνήθως μειώνει την Φ_{CL}. Η μοναδική δημοσιευμένη μέθοδος παρασκευής άκυλο παραγώγων της λουμινόλης είναι από τα δραστικά άκυλο χλωρίδια οξέων σε διαλύτη *N*,*N'*-διμεθυλοφορμαμίδιο παρουσία πυριδίνης (σχήμα 8). Ο συγκεκριμένος διαλύτης χρησιμοποιείται λόγω της καλής διαλυτότητας της λουμινόλης σε αυτόν.



Σχήμα 8. Γενική αντίδραση ακυλίωσης της λουμινόλης. Συνθήκες: (α) RCOCI, πυριδίνη,DMF, rt (β) CSCI₂, TEA, DMF, 0°C.

Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι οι συνθήκες της αντίδρασης καθορίζουν τα προϊόντα που θα σχηματιστούν κάθε φορά. Με άλλα λόγια, σύμφωνα με την βιβλιογραφία,^{100,131} πέραν της ακυλίωσης της άμινο ομάδας, μπορεί να πραγματοποιηθεί και διακυλίωση είτε των υδραζιδικών ατόμων αζώτου είτε των ατόμων οξυγόνου, προς σχηματισμό των διάκυλων παραγώγων της λουμινόλης. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι όταν η αντίδραση ακυλίωσης προϊόν από αντίδραση αφυδάτωσης μεταξύ της άμινο και ακετόξυ ομάδας (σχήμα 9).



Σχήμα 9. Ακυλοπαράγωγα της λουμινόλης

Συνοψίζοντας, τα μέχρι τώρα προϊόντα ακυλίωσης της λουμινόλης φέρουν φαίνυλο ομάδες και κορεσμένες άλκυλο ομάδες συνδεδεμένες με τη καρβόξυλο ομάδα (ακετάμιδο και προπυλάμιδο ομάδα), παράγωγα λιπαρών οξέων (ενδεκενάμιδο ομάδα) και παράγωγα του σουκινικού οξέος.^{101,120,108}Ακόμη, η αντίδραση θειοκαρβονυλίωσης της άμινο ομάδας της λουμινόλης που έχει αναφερθεί βιβλιογραφία προέρχεται από στη ακυλίωση παρουσία Ν,Ν'-διμεθυλοφορμαμίδιο θειοφωσγένιου σε διαλύτη παρουσία τριαιθυλαμίνης(σχήμα 8).108

Με βάση τη βιβλιογραφία, τα άκυλο παράγωγα της λουμινόλης που έχουν συντεθεί μέχρι σήμερα, εμφανίζουν μόλις το 5-10% της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης, καθώς η ακυλίωση της άμινο ομάδας μειώνει την CL λόγω επαγωγικού φαινομένου και στερεοχημικών αλληλεπιδράσεων που προκαλεί η άκυλο άμιδο ομάδα.¹¹⁷⁻¹¹⁹

Αντίδραση αλκυλίωσης

Από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί η αλκυλίωση της άμινο ομάδας της λουμινόλης αποτελεί αντίδραση υποκατάστασης που ελαττώνει εξίσου την Φ_{CL}.¹⁰⁴⁻¹⁰⁷Η σύνθεση των αλκυλο παραγώγων της λουμινόλης πραγματοποιείται

σύμφωνα με την μέθοδο σύνθεσή της (σχήμα 5). Δηλαδή, ξεκινώντας από ένα πρόδρομο μόριο του φθαλυδραζιδίου, είτε ένα Ν-αμινοφθαλιμίδιο είτε τον 3αμινοφθαλικό ανυδρίτη μέσω αντίδρασης αλκυλίωσης από διάφορα διαλογονίδια και αλκυλαλογονίδια, καταλήγουμε στα αντίστοιχα αλκυλιωμένα παράγωγα. Κατόπιν, αυτά μέσω αντίδρασης υδραζινόλυσης σε συνθήκες ίδιες με την αντίδραση υδραζινόλυσης του πρόδρομου της λουμινόλης, δίνουν τα τελικά αλκυλιωμένα παράγωγα.



Σχήμα 10. Γενική αντίδραση αλκυλίωσης της λουμινόλης, όπου X=Y=Br, X=αλκάνια, αλκένια, Y=Br) και R=O, NH,NR).

Έχει εξεταστεί η ένταση CL αλκυλιωμένων παραγώγων της λουμινόλης σε σύστημα NaOH/αιμίνη/H₂O₂ και έχει βρεθεί ότι η μεθυλίωση της άμινο ομάδας της λουμινόλης οδηγεί σε χαμηλή χημειοφωταύγεια, ενώ η διμεθυλίωση σε ακόμα μικρότερη τιμή. Αξιοσημείωτο είναι το ότι ο ίδιος τύπος υποκατάστασης σε ισολουμινόλη (αλκυλίωση και διαλκυλίωση) ενισχύει την Φ_{CL} των παραγώγων.^{104,107}Αυτή η παρατήρηση έχει αποδοθεί στις ηλεκτρονιακές και στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις: η αλκυλίωση της άμινο ομάδας καθιστά ηλεκτρονιακά πλούσιο τον αρωματικό δακτύλιο (έτσι ενισχύεται η CL όπως αναφέρθηκε παραπάνω), αλλά στην περίπτωση της λουμινόλης, όσο πιο ογκώδης είναι η αλκυλιωμένη άμινο ομάδα, τόσο περισσότερο αποκλίνει από το επίπεδο του αρωματικού δακτυλίου, και κατά συνέπεια το φαινόμενο συντονισμού είναι ασθενέστερο. Τέλος, ορισμένα παράγωγα ισολουμινόλης, στα οποία η αρωματικότητα έχει ενισχυθεί από γνωστές χρωμοφόρες ενώσεις, μπορεί να εμφανίσουν εντάσεις χημειοφωταύγειας 3100 φορές υψηλότερες από αυτή που παρουσιάζει η λουμινόλη.^{95,110}

45



Σχήμα 11. Παραδείγματα αλκυλιωμένων παραγώγων λουμινόλης και ισολουμινόλης.

4.7 Εφαρμογές της λουμινόλης

Η γνώση του μηχανισμού χημειοφωταύγειας της λουμινόλης και η κινητική μελέτη των σχετικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα έδωσε το έναυσμα για την ανάπτυξη εφαρμογών στους τομείς της αναλυτικής χημείας, της χημείας τροφίμων, της βιοχημείας και φαρμακοχημείας, καθώς και στη χημεία περιβάλλοντος.

Η πιο γνωστή εφαρμογή της λουμινόλης είναι ο εντοπισμός κηλίδων αίματος σε αστυνομικές έρευνες. Τα τελευταία χρόνια, μεγάλος αριθμός ποικίλων ενώσεων, όπως μεταλλικά ιόντα, φυτοφάρμακα, αμινοξέα και γενικά ρύποι και τοξικές ουσίες έχουν ελεγχθεί με αναλυτικές μεθόδους, όπως η ανάλυση έγχυσης ροής (FIA), σύμφωνα είτε με την αναστολή τους, είτε με την ενίσχυση ή καταλυτική τους επίδρασηεπί της αντίδρασης χημειοφωταύγειας της λουμινόλης. Σε πολύπλοκα συστήματα, όπως τα υγρά του ανθρώπινου οργανισμού, που περιέχουν περισσότερες από μια δραστικές ενώσεις-αναλύτες, η σήμανση των ενώσεων προς ανάλυση με λουμινόλη αποτελεί ένα επιτυχημένο τρόπο διαχωρισμού και εντοπισμού τους μέσω της καταγραφής της εκπεμπόμενης χημειοφωταύγειας. Έτσι, έχει αναπτυχθεί μεγάλη ποικιλία παραγώγων της λουμινόλης, με μικρότερη ωστόσο απόδοση χημειοφωταύγειας από τη μητρική ένωση, τα οποία χρησιμεύουν στη σήμανση αμινοξέων, πεπτιδίων, της αμφεταμίνης και μεταμφεταμίνης, της ισταμίνης,της ιβουπροφαίνης και άλλων ενώσεων. Επίσης, ο διαχωρισμός και ο εντοπισμός των ενώσεων-αναλυτών μπορεί να γίνει μέσω της καταγραφόμενης επίδρασης κάθε μεμονωμένης ένωσης αντίδραση χημειοφωταύγειας. Ακόμη, στην 0 μηχανισμός χημειοφωταύγειας της λουμινόλης αποτελεί τη βάση της ανάπτυξης βιοχημικών αναλυτικών συστημάτων, όπως οι βιοαισθητήρες, οι ανοσολογικές δοκιμασίες,

οι ανοσοαισθητήρες και οι μικροσυστοιχίες. Δηλαδή, η αντίδραση χημειοφωταύγειας μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα βιοχημικό σύστημα μέσω της χρήσης ανοσοαντιδράσεων με υπεροξειδάση ή με επισημασμένα με λουμινόλη αντισώματα, υποδεικνύοντας είτε την αλληλεπίδραση της επισημασμένης οντότητας είτε την ανίχνευση του παραγόμενου H₂O₂. Σε αυτές τις περιπτώσεις, ανιχνεύονται φυτοφάρμακα, τοξίνες, εκρηκτικές ύλες, απορρυπαντικά,πρωτεΐνεςή ακόμα και ολόκληρα ζωντανά κύτταρα.

Τέλος, έχουν αναπυχθεί ενδιαφέρουσες προσεγγίσεις για την εξειδικευμένη ανίχνευση συγκεκριμένων ενώσεων σε σύνθετα συστήματα με βάση τη διαδοχική χρήση εκλεκτικών ενζυμικών αντιδράσεων και της ανίχνευση της χημειοφωταύγειας. Τα συστήματα που θα υποστούν αυτή τη διαδικασία, απαιτούν H₂O₂. Το ενδιαφέρον σε αυτά τα συστήματα έγκειται στη σύζευξη των ενώσεων με το H₂O₂-ένζυμο, που καθιστά δυνατή την ανίχνευση ειδικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων της γλυκόζης, του γαλακτικού και ουρικού οξέος, της χοληστερόλης, της ξανθίνης, της χολίνης, κ.α.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα είναι ένα από τα πιο επιθετικά είδη καρκίνου που μαστίζει την εποχή μας. Το ποσοστό επιβίωσης από αυτή την ασθένεια είναι μόλις 4%. Αυτό καθιστά την ανάγκη καταπολέμησης του επιτακτική. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση νέων μιτοτροπικών οργανικών ενώσεων, παραγώγων της λουμινόλης, που θα στοχεύουν εκλεκτικά στη καταπολέμηση του εγκεφαλικού αυτού καρκίνου.

Αυτές οι ενώσεις θα εμφανίζουν τα εξής ιδιαίτερα χαρακτηριστικά:

- Το ένα τους τμήμα θα αποτελείται από τη λουμινόλη. Όπως εξηγήθηκε στην εισαγωγή, η λουμινόλη έχει την ιδιότητα να χημειοφωταυγεί όταν βρεθεί στις κατάλληλες οξειδωτικές συνθήκες. Μέσα στο κύτταρο, υπάρχουν οι προϋποθέσεις, ώστε η λουμινόλη να οξειδωθεί παράγοντας ακτινοβολία με λ_{max}≈425nm.
- Το άλλο τους τμήμα θα αποτελείται από τριφαινυλοφωσφονιακά αλογονούχα άλατα συνδεδεμένα,με το τμήμα της λουμινόλης, μέσω μίας αλειφατικής αλυσίδας. Από προηγούμενες μελέτες, έχει διαπιστωθεί ότι ενώσεις που φέρουν τριφαινυλοφωσφονιακάάλαταμπορούν να εισάγονται αποτελεσματικά στα κύτταρα στοχεύοντας στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Συγκεκριμένα, τα τριφαινυλοφωσφονιακά άλατα λόγω του λιπόφιλου χαρακτήρα τους έχουν την ιδιότητα να εισέρχονται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, ενώ ο υδρόφιλος χαρακτήρας τους, καθώς είναι άλατα, τα καθιστά διαλυτά στο εσωτερικό του κυττάρου. Με αυτό τον τρόπο, μπορούν να λειτουργήσουν ως μεταφορείς δραστικών ενώσεων στο εσωτερικό και των καρκινικών κυττάρων.

Η πορεία δράσης των ενώσεων-στόχων είναι η ακόλουθη:Η ένωση-στόχος εισέρχεται μέσα στο μιτοχόνδριο του κυττάρου, καρκινικό ή υγιές, λόγω της λιποφιλικότητας που της προσδίδει το κατιόν της τριφαινυλοφωσφίνης. Όταν πρόκειται για καρκινικό εγκεφαλικό αστροκύτταρο τύπου IV, στο εσωτερικό της μιτοχονδριακής του μεμβράνης η συγκέντρωση των ενεργών μορφών του O₂

(O2^{-*}, OH^{*}), τα οποία παράγονται κατά τη σύνθεση της ATP είναι αυξημένη. Ακόμη, αυξημένη είναι και η συγκέντρωση της πρωτοπορφυρίνης ΙΧ, που δεν αντέδρασε με το Fe²⁺ για το σχηματισμό της αίμης, λόγω μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας που περιγράφεται στην εισαγωγή. Η πρωτοπορφυρίνη ΙΧ παράγεται μέσω της οδού σύνθεσης της αίμης, από το υπόστρωμα αμινολεβουλινικό οξύ (ALA). Χαρακτηριστικό της πρωτοπορφυρίνης ΙΧ είναι ότι παρουσιάζει ισχυρή απορρόφηση στην περιοχή των 420 nm, σχηματίζοντας, αποδιεγειρόμενη παρουσία οξυγόνου, οξυγόνο απλής κατάστασης που έχει ισχυρές κυτταροτοξικές επιδράσεις καταστρέφοντας το καρκινικό κύτταρο εκ των έσω. Έτσι, από τη στιγμή που εισέρχεται η ειδικά τροποποιημένη (μιτοτροπική) λουμινόλη στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου του καρκινικού κυττάρου, και λόγω της ικανής συγκέντρωσης των ιόντων του σιδήρου (καταλύτης της αντίδρασης χημειοφωταύγειας) και των δραστικών μορφών οξυγόνουO2^{-*} και OH^{*}, που μετατρέπονται σε H₂O₂, ξεκινάει η οξείδωση της λουμινόλης. Τότε, εκπέμπεται η χαρακτηριστική ακτινοβολία με λ_{max}≈425nm, στο μηκός κύματος δηλαδή που απορροφάει η πρωτοπορφυρίνη ΙΧ. Έτσι, τα μόρια πρωτοπορφυρίνης ΙΧ απορροφούν την εκπεμπόμενη ακτινοβολία, που προέρχεται από την οξείδωση της λουμινόλης, και παράγουν οξυγόνο απλής κατάστασης. Αυτό αποτελεί ισχυρό κυτταροτοξικό παράγοντα, ο οποίος σκοτώνει επιλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα, καθώς μόνο αυτά εμφανίζουν τις κατάλληλες συνθήκες για να πραγματοποιηθεί η οξείδωση της ειδικά τροποποιημένης, μιτοτροπικής λουμινόλης.



Σχήμα 12. Γενική επισκόπηση της αναμενόμενης δράσης της ειδικά τροποποιημένης λουμινόλης.

Με βάση το παραπάνω σκεπτικό, στόχος της παρούσας διατριβής είναι η σύνθεση μιτοτροπικών παραγώγων της λουμινόλης που εμφανίζουν τη γενική δομή του σχήματος 13. Η σύνθεσή τους στηρίζεται στην καρβονυλίωση (X=O) και θειοκαρβονυλίωση (X=S) της 5-αμινοομάδας της λουμινόλης με τα κατάλληλα παράγωγα ανθρακικής αλυσίδας, που φέρουν τριφαινυλοφωσφονιακά κατιόντα. Τα προϊόντα αυτά συνδυάζουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, έτσι ώστε να αποτελέσουν πιθανές ενώσεις με την επιθυμητή δράση κατά του πολύμορφου γλοιβλαστώματος.





ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Συνθετική προσέγγιση μιτοτροπικών παραγώγων της λουμινόλης μέσω ακυλίωσης αυτής

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζονται οι συνθετικές πορείες που εφαρμόστηκαν για τη σύνθεση των μιτοτροπικών παραγώγων της λουμινόλης 3 και 4 που τέθηκαν ως πρωταρχικός στόχος της παρούσας εργασίας (σχήμα 14)και βασίζονται στην ακυλίωση της άμινο ομάδας της λουμινόλης χρησιμοποιώντας διάφορα ακυλιωτικά μέσα. Πιο συγκεκριμένα, η λουμινόλη (χημειοφωταυγές κέντρο) ενώνεται μέσω μιας αλειφατικής ανθρακικής αλυσίδας με το βρωμιούχο άλας του τριφαινυλοφώσφινο κατιόντος (μιτοτροπικό κέντρο). Η ανθρακική αυτή αλυσίδα προσδένεται μέσω αμιδικού δεσμού στην 5-άμινο ομάδα της λουμινόλης, καθώς αυτή είναι η πιο δραστική ομάδα του μορίου, η παραγωγοποίηση οποίας δεν παρεμποδίζει της тпу αντίδραση χημειοφωταύγειας. Επίσης, η αλειφατική αλυσίδα προσδίδει την απαραίτητη ευκαμψία στο μόριο για χρήση σε βιολογικά συστήματα. Χρησιμοποιήθηκαν 2 μεγέθη ανθρακικής αλυσίδας, με 5 και 10 άτομα άνθρακα, για να διαπιστωθεί τυχόν επίδραση του μεγέθους αφενός στη συνθετική πορεία των μιτοτροπικών ενώσεων-στόχων και αφετέρου στις φωτοφυσικές ιδιότητες και τη βιολογική δραστικότητά τους.



Σχήμα 14. Γενικό ρετροσυνθετικό σχήμα των ενώσεων στόχων 3 και 4, μέσω ακυλίωσης της λουμινόλης.

6.1 Συνθετική προσέγγιση με χρήση τριφαινυλοφωσφινο-αλκυλοκαρβοξυλικών οξέων και παραγώγων τους ως ακυλιωτικά μέσα.

Ως πρώτη προσέγγιση για τη σύνθεση των ενώσεων-στόχων **3** και **4**, επιλέχθηκε αυτή της ακυλίωσης της λουμινόλης με χρήση των τριφαινυλοφωσφινο-άλκυλο οξέων **5** και **6** (σχήμα 15).¹²⁶ Τα οξέα αυτά συντέθηκαν από τα αντίστοιχα βρωμο-άλκυλο οξέα **7** και **8** μέσω αντίδρασης πυρηνόφιλης υποκατάστασης με χρήση τριφαινυλοφωσφίνης σε διαλύτη ακετονιτρίλιο με θέρμανση στους 80 °C και σε αποδόσεις 87% και 80% αντίστοιχα.



Σχήμα 15. Σύνθεση των οξέων 5 και 6. Συνθήκες: PPh₃, MeCN, 80 °C, o/n.

Στο φάσμα ¹H-NMR της ένωσης **5** παρατηρείται η χαρακτηριστική πολλαπλή κορυφή στην περιοχή των 3.58-3.86 ppmστην οποία συντονίζονται τα πρωτόνια της μεθυλένο ομάδας που βρίσκεται δίπλα στην τριφαινυλοφωσφίνη, καθώς και η τριπλή κορυφή στα 2.40 ppm που αποδίδεται στην α-μεθυλένο, ως προς το καρβοξύλιο, ομάδα (εικόνα 8). Στο φάσμα ³¹P-NMR της ίδιας ένωσης, παρατηρείται στα 25.09 ppm το σήμα της χημικής μετατόπισης του φωσφόρου, το οποίο εμφανίζεται μετατοπισμένο σε σχέση με αυτό της τριφαινυλοφωσφίνης (-4.42 ppm). Αντίστοιχη εικόνα παρουσιάζουν και τα φάσματα του οξέος **6**.



Εικόνα 8. Φάσματα ¹Η και ³¹Ρ NMR της ένωσης 5 σε CDCI₃.

6.1.1 Ακυλίωση μέσω χλωριδίων οξέων.

Έχοντας συνθέσει τα οξέα **5** και **6**, διερευνήθηκε η πιθανότητα μετατροπής τους στα αντίστοιχα ακυλοχλωρίδια, και κατόπιν η αντίδραση αυτών *insitu*με τη λουμινόλη προς το σχηματισμό των επιθυμητών προϊόντων **3** και **4** (σχήμα 16). Έτσι, το οξύ **5**θερμάνθηκε με αναρροή σε θειονυλοχλωρίδιο για 3 ώρες προς το σχηματισμό του ακυλοχλωριδίου **X**, ως ενδιάμεσο, το οποίο στη συνέχεια, χωρίς να απομονωθεί, τοποθετήθηκε για αντίδραση με τη λουμινόλη παρουσία τριαιθυλαμίνης σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο. Παρά τις επανειλημμένες προσπάθειες, το επιθυμητό προϊόν δεν παραλήφθηκε υπό αυτές τις συνθήκες. Η αντίδραση,μεταξύ άλλων,επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας διαφορετικά ισοδύναμα λουμινόλης, όμως σε κάθε περίπτωση ελήφθη πολύπλοκο μίγμα προϊόντων που δεν μπορούσε να διαχωριστεί και να ταυτοποιηθεί. Αντίστοιχα



Σχήμα 16. Αντίδραση της λουμινόλης με τα χλωρίδια των οξέων 5 και 6. Συνθήκες: (α) SOCI₂, Δ, 3 h, (β) TEA, DCM, rt, o/n..

6.1.2 Ακυλίωση μέσω σύζευξης με χρήση καρβοδιιμιδίων.

Υποθέτοντας ότι οι αντιδράσεις της λουμινόλης με χλωρίδια οξέων έδωσαν μίγματα προϊόντων λόγω της υψηλής δραστικότητας των συνθηκών ακυλίωσης, αποφασίστηκε να διερευνηθεί η αντίδραση των οξέων **5** και **6** με τη λουμινόληκάνοντας χρήση καρβοδιιμιδίων, ως αντιδραστηρίων σύζευξης. Η ακυλίωση υπό αυτές τις ηπιότερες συνθήκες θα μπορούσε να οδηγήσει στο επιθυμητό αποτέλεσμα, δίνοντας παράλληλα λιγότερα παραπροϊόντα.

Έτσι, πραγματοποιήθηκε μια σειρά από αντιδράσεις σύζευξης της λουμινόλης **9** με το οξύ **5** προς σχηματισμό της τελικής ένωσης **3** (σχήμα 17 καιπίνακας 1).

- Παρουσία Ν,Ν'-δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμιδίου (DCC) σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο.
- Παρουσία DCC σε διαλύτη διμεθυλοφορμαμίδιο. Λόγω κακής διαλυτότητας της λουμινόλης στο διχλωρομεθάνιο δοκιμάστηκε ως διαλύτης το διμεθυλοφορμαμίδιο.
- Παρουσία υδροχλωρικού 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)καρβοδιιμιδίου (EDC) και υδροξυβενζοτριαζολίου (HOBt). Λόγω δυσκολίας στον καθαρισμό του μίγματος προϊόντων από το DCC και την παραγόμενη DCU, δοκιμάστηκε ως συζευκτικό το EDC, αλλά το αποτέλεσμα ήταν το ίδιο.
- 4. Παρουσία EDC και 4-διμεθυλοαμινοπυριδίνης (DMAP). Δοκιμάστηκε ως βάση το DMAP και χρησιμοποιήθηκαν περισσότερα ισοδύναμα του EDC.

Σε καμία από τις παραπάνω περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος και παραλήφθηκαν πολύπλοκα μίγματα προϊόντων που δεν μπόρεσαν να διαχωριστούν και να ταυτοποιηθούν. Οι παραπάνω αντιδράσεις διερευνήθηκαν και στην περίπτωση του οξέος **6**, με παρόμοια όμως αποτελέσματα.


Σχήμα 17. Αντιδράσεις σύζευξης της λουμινόλης με τα οξέα 5 και 6 με τη χρήση καρβοδιιμιδίων. Συνθήκες: (α) Πίνακας 1, (β) EDC, NHS, DCM/THF (1:1), rt, o/n, (γ) TEA, DMF, 80 °C, o/n.

Πίνακας 1. Συνθήκες αντιδράσεων σύζευξης της λουμινόλης με τα οξέα 5 ή 6 με τη χρήση καρβοδιιμιδίων.Πίνακας 1. Συνθήκες αντιδράσεων σύζευξης της λουμινόλης με τα οξέα 5 ή 6 με τη χρήση καρβοδιιμιδίων.

α/α	Αντιδραστήρια	Διαλύτης	Προϊόν
1	DCC (2 eq)	DCM	-
2	DCC (2 eq)	DMF	-
3	EDC (2eq),HOBt (1 eq)	DMF	-
4	EDC (4 eq), DMAP (0.8 eq)	DMF	-

Καθώς οι παραπάνωαντιδράσεις σύζευξης της λουμινόλης 9 με τις ενώσεις 5 και 6 δεν οδήγησαν στα επιθυμητά προϊόντα3 και 4 αντίστοιχα, μας οδήγησε σε προσπάθειες σύζευξης μέσω των αντίστοιχων *Ν*-υδροξυσουκινιμιδικών (NHS) εστέρων (10 και 11, σχήμα 17). Σε αυτή την περίπτωση, τα οξέα μετατρέπονται στουςNHS εστέρες, οι οποίοι εμφανίζουν αυξημένη δραστικότητα. Αυτό, σε συνδυασμό με το ότι η NHS είναι καλή αποχωρούσα ομάδα, ευνοεί την αντίδραση των NHS εστέρων με αμίνες προς σχηματισμό αμιδίων σε καλές αποδόσεις.

Με βάση τα παραπάνω, το οξύ **5** αντέδρασε με *Ν*-υδροξυσουκινιμίδιο παρουσία του συζευκτικού αντιδραστηρίου EDC σε μίγμα διαλυτών διχλωρομεθάνιο/τετραϋδροφουράνιο 1/1 προς σχηματισμό του εστέρα **10** (σχήμα 17), σε απόδοση 82%. Στο φάσμα ¹Η NMR της ένωσης **10** παρατηρείται η χαρακτηριστική απλή κορυφή στα 2.75 ppm όπου συντονίζονται τα πρωτόνια του σουκινιμιδικού δακτυλίου. Με παρόμοιο τρόπο επιτεύχθηκε και η σύνθεση του εστέρα **11**.



Εικόνα 9. Φάσματα ¹Η NMR και ³¹Ρ της ένωσης 10 σε CDCI₃.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση της ένωσης **10** με τη λουμινόλη παρουσία τριαιθυλαμίνης σε διαλύτη διμεθυλοφορμαμίδιο στους 80 °C προς σχηματισμό της ένωσης **3**. Δεν κατέστη δυνατή η απομόνωση της ένωσης **3** ούτε υπό αυτές τις συνθήκες. Το αποτέλεσμα ήταν μίγμα των ενώσεων **5**, **10** και του προϊόντος **3**, σύμφωνα με τα φάσματαμάζας,το οποίο, παρά τις

επανειλημμένες προσπάθειες, δεν μπορούσε να διαχωριστεί. Ίδια αποτελέσματα έδωσε και η αντίδραση του εστέρα **11**.

6.1.3 Ακυλίωση μέσω ενεργοποιημένου ανυδρίτη.

Μια άλλη προσέγγιση για τη σύνθεση των μιτοτροπικών ενώσεων-στόχων περιλαμβάνει τη μετατροπή του οξέος σε ενεργοποιημένο ανυδρίτη και,στη συνέχεια, αντίδραση του τελευταίου με τη λουμινόλη (σχήμα 18). Παρόμοια αντίδραση έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία^{112,132} για τη σύνθεση παραγώγων της λουμινόλης. Έτσι, η ένωση 5 αντέδρασε με χλωροφορμικό αιθυλεστέρα παρουσία τριαιθυλαμίνης σε N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο στους -10 °C προς σχηματισμό του μικτού ανυδρίτη Α (σχήμα 18). Ο ανυδρίτης αυτός δεν απομονώθηκε, αλλά στο μίγμα της αντίδρασης προστέθηκε αιώρημα λουμινόλης και πυριδίνης σε διαιθυλαιθέρα. Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε στους -10 °C για μια ώρα και ύστερα σε θερμοκρασία δωματίου. Από την αντίδραση παραλήφθηκε μίγμα προϊόντων, στο φάσμα μάζας του οποίου ήταν εμφανής, μεταξύ άλλων, και η κορυφή του μοριακού ιόντος της 3. Έτσι, έγιναν προσπάθειες καθαρισμού του προϊόντος 3, οι οποίες περιλάμβαναν καταβύθιση από διάφορους διαλύτες, χρωματογραφία στήλης (silicagel, sephadex) με διάφορα συστήματα διαλυτών και παρασκευαστική πλάκα TLC. Τελικά, ξανά κατέστη αδύνατον να απομονωθεί το επιθυμητό προϊόν.



Σχήμα 18. Αντίδραση της λουμινόλης με τους ανυδρίτες των οξέων 5 και 6. Συνθήκες: (α) CICOOEt, TEA, DMF, -10 °C, 1h. (β) Πυριδίνη, Et₂O, -10 °C σε rt, o/n.

Η ίδια πορεία ακολουθήθηκε και για τη σύνθεση της ένωσης 4, μέσω αντίδρασης της λουμινόλης με τον ανυδρίτη του οξέος 6 (σχήμα 18). Πραγματοποιήθηκε κινητικός έλεγχος της αντίδρασης σχηματισμού του ενδιάμεσου ανυδρίτη B από το οξύ 6 και διαπιστώθηκε πως η αντίδραση ευνοείται σε χαμηλές θερμοκρασίες -15 °C μέχρι -5°C και ότι ο χρόνος παραμονής του ανυδρίτη Bστο μίγμα της αντίδρασης πριν την προσθήκη της λουμινόλης δεν πρέπει να ξεπερνά την μιάμιση ώρα, καθώς αρχίζουν να εμφανίζονται νέες κηλίδες στο TLC σε διαφορετικό Rf από το αναμενόμενοRf της ένωσης B. Παρ' όλο που βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες σχηματισμού του ανυδρίτη B και ακολούθησε η αντίδραση της λουμινόλης με την ένωση B, ούτε σ' αυτή τη περίπτωση καταφέραμε να απομονώσουμε το επιθυμητό προϊόν.

6.1.4 Ακυλίωση μέσω αντίδρασης με εστέρα.

Μια διαφορετική προσέγγιση, με σκοπό τη σύνθεση του προϊόντος **3**, είναι ο σχηματισμός του αιθυλεστέρα της ένωσης **12**, ξεκινώντας από την ένωση 5, και η αντίδρασή του με τη λουμινόλη. Συγκεκριμένα, το οξύ **5** αντιδρά με καταλυτική ποσότητα πυκνού θειϊκού οξέος σε μίγμα διαλυτών τολουόλιο/αιθανόλη 1/1 στους 90 °C σε συσκευήDean-Stark προς σχηματισμό του εστέρα **12**(σχήμα 19).



Σχήμα 19. Αντίδραση της λουμινόλης με τον εστέρα του οξέος 5. Συνθήκες: (α) MePh/EtOH: 1/1, κατ. Η₂SO₄, 90 °C, (β) κατ. KOH, EtOH, 70 °C

Στο φάσμα ¹Η NMR της ένωσης **12** (εικόνα 10) παρατηρείται η χαρακτηριστική τετραπλή κορυφή στα 4.33 ppm, όπου συντονίζονται τα πρωτόνια του μεθυλενίου του αιθυλεστέρα, και η χαρακτηριστική τριπλή κορυφή στα 1.42 ppm όπου συντονίζονται τα πρωτόνια του μεθυλίου του αιθυλεστέρα. Στο φάσμα ³¹P-NMR της ίδιας ένωσης, παρατηρείται στα 28.82 ppm το σήμα της χημικής μετατόπισης του φωσφόρου.



Εικόνα 10. Φάσματα ¹Η NMR και ³¹Ρ της ένωσης 12 σε CDCI_{3.}

Στη συνέχεια, ακολούθησε η αντίδραση του εστέρα **12** με τη λουμινόλη παρουσία καταλυτικής ποσότητας υδροξειδίου του καλίου σε αιθανόλη και θέρμανση στους 70 °C. Η αντίδραση δεν προχώρησε ούτε σε αυτή την περίπτωση. Πιθανή αιτία της μη πραγματοποίησης της αντίδρασης θα μπορούσε να θεωρηθεί η μειωμένη δραστικότητα της αποχωρούσας αιθυλενο ομάδας.

6.2 Συνθετική προσέγγιση με χρήση βρωμο-αλκυλο-καρβοξυλικών οξέων ως ακυλιωτικών μέσων.

Ακολούθως, υποθέσαμε ότι μια πιθανή αιτία για την οποία δεν προχωρούσαν οι αντιδράσεις ακυλίωσης της λουμινόλης θα μπορούσε να είναι η ύπαρξη της τριφαινυλοφωσφίνης. Με άλλα λόγια, η τριφαινυλοφωσφίνη θα μπορούσε να επιδρά στερεοχημικά ή ηλεκτρονικά με τρόπο ώστε να αποτρέπει τον σχηματισμό των ενώσεων **3** και **4**. Γι' αυτό το λόγο, ακολουθήθηκε νέα στρατηγική, ξεκινώντας από την ακυλίωση της λουμινόλης από τα οξέα **7** και **8** και καταλήγοντας στην πυρηνόφιλη υποκατάσταση του ατόμου του βρωμίου από την τριφαινυλοφωσφίνη. Συγκεκριμένα, οι τελικές ενώσεις **3** και **4** θα μπορούσαν να προκύψουν από τις ενώσεις **13** και **14** αντίστοιχα και αυτές με την σειρά τους από τις ενώσεις **7** και **8** κατά την αντίδρασή τους με λουμινόλη.



Σχήμα 20. Ρετροσυνθετική πορεία των ενώσεων 3 και 4 μέσω βρωμιωμένων παραγώγων της λουμινόλης.

6.2.1 Ακυλίωση μέσω σύζευξης με χρήση καρβοδιιμιδίων.

Έχοντας ως στόχο την ακυλίωση της άμινο ομάδας της λουμινόλης, πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από προσπάθειες σύζευξης των εμπορικά διαθέσιμων 11-βρωμοενδεκανοϊκού και 6-βρωμοεξανοϊκού οξέων με τη λουμινόλη(**9**) προς σχηματισμό των ενώσεων **13** και **14** αντίστοιχα (σχήμα 21) κάτω από διάφορες συνθήκες.



Σχήμα 21.Αντιδράσεις σύζευξης της λουμινόλης με τα οξέα 7 και 8 με τη χρήση καρβοδιιμιδίων. Συνθήκες: (α) i) DCC (1.5 eq), DCM, ή ii) DCC (3 eq), HOBt (1 eq), DCM ή DMF, ή iii) DCC (3 eq), DMAP (0.8 eq), DCM, ή iv) EDC (1.5 eq), DMF, ή v) EDC (2 eq), DMAP (1.5 eq), DMF

Σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος και αντί αυτού παραλήφθηκαν πολύπλοκα μίγματα προϊόντων που δεν μπόρεσαν να διαχωριστούν και να ταυτοποιηθούν.

6.2.2 Ακυλίωση μέσω χλωριδίων οξέων.

Δεδομένου ότι η αντίδραση σύζευξης λουμινόλης 9 με τα οξέα 7 και 8 δεν οδήγησε στα επιθυμητά προϊόντα 13 και 14 αντίστοιχα, διερευνήθηκε η ακυλίωση μέσω χλωριδίων των οξέων 7 και 8 (σχήμα 22). Έτσι, το οξύ 7 έβρασε σε θειονυλοχλωρίδιο για 3 ώρες προς το σχηματισμό του ακυλοχλωριδίου W ως ενδιάμεσο, το οποίο στη συνέχεια, χωρίς να απομονωθεί, τοποθετήθηκε για τριαιθυλαμίνης αντίδραση με тη λουμινόλη παρουσία σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο. Τελικά, παραλήφθηκε το επιθυμητό προϊόν 13 ως μίγμα με το οξύ 7(αναλογίας 60-40), που δεν μπορούσε να καθαριστεί περαιτέρω. Η απόδοση του βρωμιδίου 13 υπολογίστηκε σε 18%.



Σχήμα 22. Αντίδραση της λουμινόλης με τα χλωρίδια των οξέων 7 και 8. Συνθήκες: (α) SOCI₂, Δ, 3 h, (β) TEA, DCM, rt, o/n, (γ) Πίνακας 2.

Στο φάσμα ¹Η NMR του μίγματος που απομονώθηκε παρατηρείται η χαρακτηριστική ευρεία κορυφή στα 13.10 ppm, όπου συντονίζεται το αμιδικό πρωτόνιο NH, αποπροστατευμένο σε σχέση με την κορυφή που οφείλεται στα πρωτόνια της άμινο ομάδας της λουμινόλης στα 7.32 ppm. Ακόμη, τα υδραζιδικά πρωτόνια NH συντονίζονται στα 11.52 ppm ως μια ευρεία κορυφή. Οι κορυφές που οφείλονται στα πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου εμφανίζονται μετατοπισμένα σε χαμηλότερα πεδία σε σχέση με τα αντίστοιχα της λουμινόλης, λόγω της ακυλίωση της άμινο ομάδας. Έτσι, το πρωτόνιο σε όρθο θέση ως προς την αμιδική ομάδα εμφανίζεται ως μια διπλή στα 8.88 ppm (από 6.88 ppm της λουμινόλης), αυτό σε μέτα θέση ως μια τριπλή στα 7.59 ppm (από 7.45 ppm) και το πρωτόνιο σε πάρα θέση στα 7.41 ppm(από 6.94 ppm). Η ύπαρξη του 11-βρωμοενδεκανοϊκού οξέος που δεν έχει αντιδράσει καθώς και η σύσταση του μίγματος βεβαιώνεται από τη μεγαλύτερη ολοκλήρωση των αλειφατικών πρωτονίων σε σχέση με την αναμενόμενη για το13. Επίσης, στο φάσμα ¹³CNMR, διακρίνεται ο αμιδικός άνθρακας της **13** στα 172.26 ppm, καθώς και οι κορυφές που οφείλονται στο 11-βρωμοενδεκανοϊκό οξύ. Τέλος, στο φάσμα μάζας της ένωσης 13 φαίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές του μοριακού ιόντος στα 424.1 και 426.0 m/z λόγω των 2 ισοτόπων του ατόμου του βρωμίου.



Εικόνα 11. Φάσματα μάζας και ¹Η NMR της ένωσης 13 σε CDCI₃.

Αντίστοιχα αποτελέσματα έδωσε και το οξύ 8 υπό τις ίδιες συνθήκες. Με ανάλογο τρόπο πραγματοποιήθηκε η αντίδραση ακυλίωσης της λουμινόλης από το ακυλοχλωρίδιο Ζ σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο παρουσία τριαιθυλαμίνης. Παραλήφθηκε μίγμα προϊόντος - οξέος 8 αναλογίας 1/1, που δεν ήταν δυνατόν να καθαριστεί περαιτέρω. Η απόδοση του βρωμιδίου 14 υπολογίστηκε ως 5% και τα φασματοσκοπικά δεδομένα της 14 είχαν παρόμοια εικόνα με αυτά της 13. Οι ενώσεις 13 και 14 που παραλήφθηκαν ως μίγματα με τα αρχικά τους οξέα χρησιμοποιήθηκαν στο επόμενο βήμα για την σύνθεση του τελικού προϊόντος μέσω αντίδρασης πυρηνόφιλης αλειφατικής υποκατάστασης του ατόμου του βρωμίου από την τριφαινυλοφωσφίνη (σχήμα 20, πίνακας 2). Γνωρίζοντας ότι οι ενώσεις 13 και 14 αποτελούν μίγματα με τις ενώσεις 7 και 8, οι οποίες αντιδρούν με τριφαινυλοφωσφίνη προς σχηματισμό των αλκυλο-τριφαινυλοφωσφινο παραγώγων 5 και 6 αντίστοιχα, προστέθηκε περίσσεια τριφαινυλοφωσφίνης. Η αντίδραση πυρηνόφιλης υποκατάστασης του ατόμου του βρωμίου των μιγμάτων των ενώσεων 13, 14 πραγματοποιήθηκε κάτω από τις εξήςσυνθήκες και σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα¹²⁶ (πίνακας 2):

1. Υπό επαναροή σε διαλύτη MeCN για 18h.

Σύμφωνα με τα φασματοσκοπικά δεδομένα (φάσματα MS και ¹H-NMR), η αντίδραση του μίγματος της ένωσης **13** με την PPh₃ οδήγησε μόνο στο σχηματισμό της ένωσης **5** και η αντίδραση της ένωσης **14** με την PPh₃ οδήγησε στο σχηματισμό της ένωσης **6**. Το επιθυμητό προϊόν δεν παραλήφθηκε.

2. Υπό επαναροή σε μίγμα διαλυτών MeCN/DCM 1/1 για 18h.

Λόγω μειωμένης διαλυτότητας του μίγματος της αντίδρασης δοκιμάστηκε το μίγμα διαλυτών MeCN/DCM 1/1. Το επιθυμητό προϊόν δεν παραλήφθηκε.

3. Υπό επαναρροή σε μίγμα διαλυτών MeCN/DCM 1/1 για 36h.

Δοκιμάστηκε το ίδιο μίγμα διαλυτών με την αντίδραση Ν°2και αυξήθηκε ο χρόνος παραμονής της αντίδρασης.

- Υπό επαναρροή σε μίγμα διαλυτών MeCN/DCM 1/1 για 48h παρουσία 2 ισοδυνάμωνTEA.
- Υπό επαναρροή σε μίγμα διαλυτών MeCN/DCM 1/1 για 18h παρουσία πυριδίνης.

Δοκιμάστηκε η προσθήκη της πυριδίνης ως ενεργοποιητής του καρβονυλικού κέντρου στην αντίδραση S_N2. Παραλήφθηκε το ίδιο μίγμα προϊόντων με την αντίδραση N^o1.

6. Υπό επαναρροή σε διαλύτη 1,4-διοξάνιο για 48h.

Για να αυξηθεί η κινητική της αντίδρασης, χρησιμοποιήσαμε διαλύτη με μεγαλύτερο σημείο ζέσης.

7. Υπό επαναρροή σε διαλύτη DMF για 24h.

Λόγω κακής διαλυτότητας της λουμινόλης στο διχλωρομεθάνιο δοκιμάστηκε ως διαλύτης το *Ν*,*Ν*-διμεθυλοφορμαμίδιο. Παραλήφθηκε το ίδιο μίγμα προϊόντων με την αντίδραση Ν°1.

- 8. Σε διαλύτη CCl₄.
- Υπό αναρροή σε μίγμα διαλυτών MeCN/CCl₄ παρουσία νιτρικού αργύρου (AgNO₃).

Χρησιμοποιήθηκε AgNO₃, ώστε να ευνοήσει την αντίδραση παγιδεύοντας τα ιόντα του βρωμίου προς καταβύθιση του βρωμιούχου αργύρου.

10. Υπό αναρροή σε διαλύτη ακετόνηπαρουσία ιωδιούχου νατρίου (Nal).

Αρχικά, προστέθηκε το Nal στο διάλυμα της ένωσης **13** με σκοπό το βρώμιο να αντικατασταθεί από το ιώδιο που θεωρείται καλύτερο πυρηνόφιλο με καταβύθιση του ως βρωμιούχο νάτριο. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε η ακετόνη γιατί σε αυτήν το Nal είναι διαλύτο, ενώ το NaBr όχι. Στη συνέχεια, προστέθηκε στο διάλυμα η τριφαινυλοφωσφίνη, η οποία θα υποκαθιστούσε το ιώδιο που θεωρείται καλύτερη αποχωρούσα ομάδα από το βρώμιο.

	Συνθήκες	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (h)	Προϊόν
1	MeCN	75-80	18	Μίγμα
2	MeCN/DCM 1/1	70-75	18	Μίγμα

Πίνακας 2. Προσπάθειες σύνθεσης των τελικών προϊόντων 3 και 4.

3	MeCN/DCM	70-75	36	Μίγμα
	1/1			
4	MeCN/DCM	80	48	Μίγμα
	1/1			
	2 eq Et₃N			
5	MeCN/DCM	80	48	Μίγμα
	1/1			
	2 eq pyridine			
6	dioxane	105	48	Μίγμα
7	DMF	100	24	Μίγμα
8	CCl ₄	0-rt	24	Μίγμα
9	MeCN/CCI ₄	80	5	Μίγμα
	1/1			
	1 eq AgNO₃			
10	Acetone	80	5	Μίγμα
	1/1			
	1 eq Nal			

Υπό όλες τις παραπάνω συνθήκες, παραλήφθηκαν μίγματα προϊόντων εκ των οποίων κανένα προϊόν δεν μπόρεσε να απομονωθεί και να ταυτοποιηθεί. Γι' αυτό το λόγο, οδηγηθήκαμε σε μια νέα πορεία σύνθεσης του προϊόντος που αναλύεται στο Κεφάλαιο 7.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Σύνθεση μιτοτροπικών παραγώγων της λουμινόλης μέσω ακυλίωσης του 3-αμινοφθαλιμίδιου

Στο προηγούμενο κεφάλαιο περιγράφηκαν οι προσπάθειες που έγιναν για τη σύνθεση των επιθυμητών παραγώγων της λουμινόλης μέσω ακυλίωσής της, οι οποίες όμως δεν είχαν αποτέλεσμα. Ένας παράγοντας που θα μπορούσε να εμποδίσει την απομόνωση, ακόμα και το σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος, είναι η υδράζιδο ομάδα της λουμινόλης, αποπρωτονίωση της οποίας θα μπορούσε να οδηγήσει στο σχηματισμό πυρηνόφιλων κέντρων ανταγωνιστικών ως προς την άμινο ομάδα, δίνοντας μίγμα προϊόντων (σχήμα 6, Κεφάλαιο 4). Βασιζόμενοι σε αυτήν την υπόθεση, διερευνήσαμε μια νέα στρατηγική που περιλαμβάνει την ακυλίωση ενός προδρόμου της λουμινόλης χωρίς αυτά τα όξινα πρωτόνια, το οποίο στη συνέχεια θα μετατραπεί στην ακυλιωμένη λουμινόλη. Συγκεκριμένα, οι τελικές ενώσεις **3** και **4** θα μπορούσαν να προκύψουν από τις ενώσεις **16** και **17** αντίστοιχα, μέσω αντίδρασης υδραζινόλυσης, και αυτές θα μπορούσαν με την σειρά τους να προκύψουν από αντίδραση ακυλίωση της άμινο ομάδας του φθαλιμιδίου **18** (σχήμα 21).



7.1 Σύνθεση του 5-αμινοφθαλιμιδίου 18.

Το φθαλιμίδιο **18** συντέθηκε σε 3 στάδια από το 3-αμινοφθαλικό οξύ **20**. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η συμπύκνωση του οξέος **20** με οξικό ανυδρίτη και θέρμανση στους 110 °C για μια ώρα, προς σχηματισμό του 3-νιτροφθαλικού ανυδρίτη **21** σε 90% απόδοση. Στη συνέχεια, η ένωση **21** αντιδρά με την sec-βουτυλαμίνησε οξικό οξύ στους 110 °C για 3.5 ώρες δίνοντας το 3-νιτροφθαλιμίδιο **22** σε 75 % απόδοση, αναγωγή του οποίου, με καταλυτική υδρογόνωση χρησιμοποιώντας 5% Pd/C σε μεθανόλη, δίνει το αμινοφθαλιμίδιο **18** σε 71% απόδοση (σχήμα 24).



Σχήμα 24. Σύνθεση της ένωσης 18. Συνθήκες: (α) Ac₂O, 110 °C,1h, (β) sec-BuNH₂, AcOH, 110 °C, 3.5 h, (γ) H₂, Pd/C, MeOH.

Στο φάσμα ¹Η NMR της **18** παρατηρείται μια τριπλή κορυφή στα 7.26 ppm, όπου συντονίζεται το πρωτόνιο σε μέταθέση ως προς την άμινο ομάδα, και 2 διπλές κορυφές στα 6.98 και 6.77 ppm, όπου συντονίζονται τα πρωτόνια σε πάρα και όρθο θέση αντίστοιχα (εικόνα 12). Τα πρωτόνια της άμινο ομάδας εμφανίζονται ως μια ευρεία κορυφή στα 5.31 ppm. Όσον αφορά τη sec-βούτυλο ομάδα, τα μεθυλικά πρωτόνια εμφανίζονται ως μια τριπλή (2-Η) στα 0.77 ppmκαι διπλή (3-H) στα 1.35ppm αντίστοιχα, ενώ ως πολλαπλές εμφανίζονται τα διαστερεοτοπικά μεθυλενικά στη περιοχή των 2.04– 1.52 ppm, καθώς και το πρωτόνιο του ασύμμετρου ατόμου άνθρακα στη περιοχή των 4.22 ppm.



Εικόνα 12. Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 18 σε CDCI₃.

7.2 Συνθετική προσέγγιση με χρήση τριφαινυλοφωσφινο-αλκυλοκαρβοξυλικών οξέων και παραγώγων τους ως ακυλιωτικά μέσα.

Όπως και στις προσπάθειες ακυλίωσης της λουμινόλης (Κεφάλαιο 6), ως πρώτη προσέγγιση για τη σύνθεση των ενώσεων στόχων **3** και **4**, επιλέχθηκε αυτή της χρήσης των τριφαινυλοφωσφινο-άλκυλο οξέων **5** και **6** ή παραγώγων τους ως ακυλιωτικά μέσα.

7.2.1 Ακυλίωση μέσω σύζευξης με χρήση καρβοδιιμιδίων.

Έχοντας ως στόχο την σύνθεση της ένωσης **16**, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις σύζευξης της ένωσης **18** και του αλκυλοπαραγώγου της τριφαινυλοφωσφίνης (ένωση **5**) παρουσία *Ν*,*Ν*'-δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμιδίου και 4-διμεθυλαμινοπυριδίνης σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο, όμως δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός του επιθυμητού, αλλά και γενικότερα οποιουδήποτε προϊόντος (σχήμα 25). Αντίστοιχα αποτελέσματα έδωσε και το οξύ **6** υπό τις ίδιες συνθήκες.



Σχήμα 25. Αντιδράσεις σύζευξης του φθαλιμιδίου 18 με τα οξέα 5 και 6 με τη χρήση καρβοδιιμιδίων. Συνθήκες: DCC, DMAP, DCM, rt.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί το ότι η αντίδραση σύζευξης της **18** με τα οξέα **5** και **6** δεν οδήγησε στο σχηματισμό προϊόντος και παραλήφθηκαν τα αρχικά αντιδραστήρια, σε αντίθεση με την αντίστοιχη αντίδραση της λουμινόλης (Κεφάλαιο 6), που οδήγησε στο σχηματισμό πολύπλοκου μίγματος προϊόντων. Αυτή η παρατήρηση μας οδηγεί στο λογικό συμπέρασμα ότι στη δεύτερη περίπτωση (ακυλίωση της λουμινόλης), η υδράζιδο ομάδα της λουμινόλης είναι εκείνη που συμμετείχε στην αντίδραση σύζευξης και όχι η άμινο ομάδα της, η πυρηνοφιλικότητα της οποίας είναι προφανώς αρκετά ασθενής (όπως και αυτή της **18**) για να αντιδράσει υπό αυτές τις συνθήκες.

7.2.2 Ακυλίωση μέσω χλωριδίων οξέων.

Η χαμηλή πυρηνοφιλικότητα της άμινο ομάδας του φθαλιμιδίου **18** που διαπιστώθηκε παραπάνω, προέκρινε την εφαρμογή δραστικότερων συνθηκών

ακυλίωσης μέσω χλωριδίων οξέων. Έτσι, η ένωση 5 αντέδρασε με θειονυλοχλωρίδιο στους 80 °C για 3 ώρες προς σχηματισμό του ακυλοχλωριδίου ως ενδιάμεσο, το οποίο αντέδρασε χωρίς να απομονωθεί με την ένωση 18 παρουσία τριαιθυλαμίνης και πυριδίνης σε διχλωρομεθάνιο. Το μίγμα της αντίδρασης επεξεργάστηκε και καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης. Από τα φασματοσκοπικά δεδομένα (NMR, MS) του προϊόντος διαπιστώθηκε ότι παραλήφθηκε μίγμα 2 ενώσεων το οποίο δεν ήταν δυνατόν να διαχωριστεί, και οι οποίες ταυτοποιήθηκαν ως το επιθυμητό αμίδιο 16 και ένα χλωριωμένο παράγωγο, στο οποίο αποδίδεται η δομή U, σε αναλογία περίπου 1:1 (σχήμα 26). Συγκεκριμένα, η επίτευξη ακυλίωσης υποδεικνύεται από την αποπροστασία των αρωματικών πρωτονίων, σε σχέση με αυτά της 18, σε συνδυασμό με την ύπαρξη της χαρακτηριστικής πολλαπλής κορυφής των 15 πρωτονίων της τριφαινυλοφώσφινο ομάδας στο φάσμα ¹H-NMR(εικόνα 13), όπως και από την κορυφή του αμιδικού καρβονυλικού άνθρακα στα 171 ppm στο φάσμα ¹³C-NMR. Στο φάσμα μάζας διακρίνεται το μοριακό ιόν της **16** (647 m/z), καθώς και μια επιπλέον κορυφή (681 m/z) η οποία ταιριάζει με το μοριακό τύπο της 16, στην οποία όμως έχει αντικατασταθεί ένα άτομο υδρογόνου από ένα άτομο χλωρίου, και παρουσιάζει πολλαπλότητα χλωριωμένου παραγώγου (εικόνα 14). Η δομή που αποδίδεται στο χλωριωμένο παραπροϊόν είναι αυτή της U (α-χλωρίωση), λόγω της ύπαρξης μιας αρκετά αποπροστατευμένης τριπλής κορυφής στο φάσμα ¹H-NMR (4.6 ppm), καθώς και ενός σήματος στα 61 ppm στο φάσμα ¹³C-NMR, κορυφές που ταιριάζουν με το πρωτόνιο και τον άνθρακα α-χλωρίωσης. Ο σχηματισμός του χλωριωμένου παραγώγου U δεν μπορεί να εξηγηθεί με βάση κάποια γνωστή αντίδραση. Για παράδειγμα, η αντίδραση αχλωρίωσης καρβοξυλικών οξέων ή χλωριδίων τους (αντίδραση Hell-Volhard-Zelinsky)¹¹⁴γίνεται παρουσία αερίου χλωρίου. Ο σχηματισμός του **U** θα μπορούσε να εξηγηθεί με την υπόθεση ότι το θειόνυλο χλωρίδιο είχε πρόσμιξη από σουλφούρυλο χλωρίδιο (SO₂Cl₂), το οποίο είναι γνωστό ότι αποτελεί πηγή χλωρίου. Έτσι, η αντίδραση επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας οξάλυλο χλωρίδιο ως μέσο χλωρίωσης του οξέος 5. Και σε αυτή την αντίδραση όμως το αποτέλεσμα ήταν το ίδιο. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι κατά πάσα πιθανότητα το τριφαινυλοφώσφινο κατιόν παίζει κάποιο ρόλο στο σχηματισμό του χλωριωμένου παραγώγου U, αφού δεν έχει παρατηρηθεί προϊόν αχλωρίωσης σε αντίστοιχες αντιδράσεις άλλων καρβοξυλικών οξέων στην παρούσα εργασία (για παράδειγμα: Κεφάλαιο 6, σχήμα 16) καθώς και στη βιβλιογραφία.¹¹⁵ Αυτός ο νέος, μη αναμενόμενος μετασχηματισμός παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και πρόκειται να μελετηθεί ως προς τη γενικότητά του από την ερευνητική μας ομάδα άμεσα.



Σχήμα 26. Αντίδραση του ιμιδίου 18 με το χλωρίδιο του οξέος 5. Συνθήκες: (i) SOCI₂ ή (COCI)₂, Δ, 3 h, (ii) pyridine, TEA, DCM, rt, o/n.



Εικόνα 13. Φάσμα ^1H NMR του μίγματος των ενώσεων 16 και U σε CD₃OD.



Εικόνα 14. Φάσμα μάζας του μίγματος των ενώσεων 16 και U.

Παρόλα αυτά, πραγματοποιήθηκε η τελευταία αντίδραση υδραζινόλυσης του παραπάνω μίγματος σε διαλύτη αιθανόλη με θέρμανση στους 100 °C για 3 ώρες, με σκοπό την παραλαβή του τελικού προϊόντος**3**, θεωρώντας ότι η παρουσία του χλωριωμένου παραπροϊόντος δεν θα επηρέαζε την αντίδραση, ενώ ίσως και ο διαχωρισμός των προϊόντων να ήταν πιο εύκολος (σχήμα 27). Παραλήφθηκε μίγμα προϊόντων, το οποίο δεν ήταν δυνατό να διαχωριστεί, από το φάσμα μάζας του οποίου μπορούσαν να διακριθούν 4 ενώσεις: το μοριακό ιόν του προϊόντος **3**στα 606.3 m/z, το μοριακό ιόν του αντίστοιχου χλωριωμένου παραγώγου **U** στα 640.36 m/z, καθώς και τα μοριακά ιόντα των ενώσεων **5** και **19** στα 447.3 και 461.2 m/z αντίστοιχα (εικόνα 15).



Σχήμα 27. Αντίδραση υδραζυνόλυσης της ένωσης 16. Συνθήκες: NH₂NH₂·H₂O, EtOH,100 °C, 3h.



Εικόνα 15. Φάσματα μάζας των αντιδράσεων των σχημάτων 26 (αριστερά) και 27 (δεξιά) και οι χαρακτηριστικές κορυφές των προϊόντων τους.

Παρόλο που δεν κατέστη δυνατόν να απομονωθεί το επιθυμητό προϊόν **3**, καταλήξαμε σε δύο σημαντικές διαπιστώσεις: πρώτον, ότι τοπροϊόν **3** σχηματίζεται υπό αυτές τις συνθήκες, και, δεύτερον, ότι πρέπει να δοθεί προσοχή στις συνθήκες που θα πραγματοποιηθεί η αντίδραση υδραζινόλυσης,¹¹² ώστε να αποφευχθεί η υδρόλυση του αμιδικού δεσμού της **3**, όπως υποδεικνύει ο σχηματισμός των **5** και **19**.

7.2.3 Ακυλίωση μέσω ανυδριτών καρβοξυλικών οξέων.

Όπως συζητήθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, η αντίδραση ακυλίωσης του φθαλιμιδίου **18** από το δραστικό ακυλοχλωρίδιο του οξέος **5** έδωσε μίγμα του επιθυμητού προϊόντος **16** και του χλωριωμένου παραγώγου **U**. Συνεπώς, αποφασίσαμε να διερευνήσουμε ηπιότερες συνθήκες ακυλίωσης. Έτσι, μελετήθηκε μια εναλλακτική πορεία ακυλίωσης του φθαλιμιδίου **18** χρησιμοποιώντας ανυδρίτη οξέος ως ακυλιωτικό μέσο.

Σε μία διερευνητική αντίδραση, το φθαλιμίδιο **18** αντέδρασε με τον οξικό ανυδρίτη παρουσία πυριδίνης σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο, δίνοντας το ακεταμίδιο **23** σε απόδοση 72% (σχήμα 28).



Σχήμα 28. Σύνθεση της ένωσης 23.Συνθήκες: Ac₂O, pyridine, DCM, rt, o/n.

Στο φάσμα ¹Η NMR της ένωσης **23** (εικόνα 16), παρατηρείται η χαρακτηριστική ευρεία κορυφή στα 9.59 ppm,όπου συντονίζεται το αμιδικό πρωτόνιο NH, αποπροστατευμένο σε σχέση με την κορυφή που οφείλεται στα πρωτόνια της άμινο ομάδας του παραγώγου **18** (5.31 ppm). Οι κορυφές που οφείλονται στα πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου εμφανίζονται μετατοπισμένα σε χαμηλότερα πεδία σε σχέση με τα αντίστοιχα της **18**, λόγω της ακυλίωσης της άμινο ομάδας. Έτσι, το πρωτόνιο σε όρθο θέση ως προς την αμιδική ομάδα εμφανίζεται ως μια διπλή στα 8.74 ppm (από 6.98 ppm της **18**), αυτό σε μέτα θέση ως μια τριπλή στα 7.64 ppm (από 7.26 ppm) και το πρωτόνιο σε πάρα θέση στα 7.47 ppm(από 6.77 ppm). Ακόμη, στα 2.27 ppm παρατηρείται η χαρακτηριστική απλή κορυφή όπου συντονίζονται τα πρωτόνια της ακέτυλο ομάδας.



Εικόνα 16. Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 23 σε CDCI_{3.}

Το ότι η αντίδραση ακυλίωσης του πρόδρομου της λουμινόλης από τον οξικό ανυδρίτη πραγματοποιήθηκε σε καλή απόδοση, υπέδειξε τη σύνθεση του αμιδίου **16** μέσω ακυλίωσης της **18** από τον ανυδρίτη του οξέος **5**.

Έτσι, ο ανυδρίτης **24** συντέθηκε από το οξύ **5**παρουσία *Ν,Ν*δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμιδίου σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο.^{129,130} Το προϊόν παραλήφθηκε ως μίγμα με την αρχική ένωση **5** (αναλογίας 1/1), το οποίο δεν μπόρεσε να διαχωριστεί περαιτέρω, σε απόδοση 26% (σχήμα 29).



Σχήμα 29. Αντίδραση σύζευξης του οξέος 5. Συνθήκες: DCC, DCM, rt, o/n.

Στην εικόνα 17 παρατίθεται το φάσμα ¹Η NMR του μίγματος της ένωσης **24** με την αρχική ένωση **5**. Χαρακτηριστική κορυφή της ένωσης **24** είναι η τριπλή κορυφή που παρατηρείται στα 2.5 ppm όπου συντονίζονται τα *α*-πρωτόνια του ανυδρίτη. Στα 2.24 ppm παρατηρείται μια τριπλή κορυφή που συντονίζονται τα *α*-πρωτόνια του οξέος **5**.



Εικόνα 17. Φάσμα ¹Η NMR του μίγματος των ενώσεων 5 και 24 σε CD₃OD.

Στη συνέχεια, το μίγμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για αντίδραση με την αμίνη **18**, εφόσον το υπάρχον οξύ δεναναμενόταν ναεμποδίζει την αντίδραση συμπύκνωσης της αμίνης με τον ανυδρίτη.¹²⁹ Ετσι, έγινε προσπάθεια ακυλίωσης της ένωσης **18** από την ένωση **24** παρουσία πυριδίνης σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο σε θερμοκρασία δωματίου. Ωστόσο, η αντίδραση δεν πραγματοποιήθηκε.

Η ίδια αντίδραση ακυλίωσης επιχειρήθηκε σε διαλύτη πυριδίνη, κάτω από τις ίδιες συνθήκες, με στόχο η πυριδίνη ως διαλύτης να ευνοήσει τον σχηματισμό του προϊόντος. Και σε αυτή την περίπτωση, η αντίδραση δεν προχώρησε (σχήμα 30).



Σχήμα 30. Αντίδραση του ανυδρίτη 24. Συνθήκες: πυριδίνη, DCM, rt, o/n, ή πυριδίνη, rt, o/n

Η μη πραγματοποίηση της αντίδρασης οφείλεται πιθανότατα στη μειωμένη δραστικότητα του ανυδρίτη, λόγω της στερεοχημικής παρεμπόδισης από την τριφαινυλοφωσφίνη.

Συνοψίζοντας, η αντίδραση της ένωσης **18** με το δραστικό θειονυλο (ή οξαλυλο) χλωρίδιο έδωσε μίγμα του προϊόντος 16 με το χλωριωμένο παραγώγοU, το οποίο στη συνέχεια αντέδρασε με υδατικό διάλυμα υδραζίνης δίνοντας πολύπλοκο μίγμα του επιθυμητού και άλλων παραπροϊόντων. Ακόμη, η αντίδραση ακυλίωσης της ένωσης 18 από τον ανυδρίτη 24 σε ηπιότερες συνθήκες δεν πραγματοποιήθηκε, παρόλο που η αντίστοιχη αντίδραση με οξικό ανυδρίτη έδωσε το ακετυλιωμένο προϊόν. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η τριφαινυλοφωσφίνη επηρεάζει πορεία της αντίδρασης, 3TÌ3 την παρεμποδίζοντας στερεοχημικά την αντίδραση λόγω του μεγέθους της είτε ευνοώντας τον σχηματισμό χλωριωμένων παραγώγων. Επιπλέον, το γεγονός ότι η αντίδραση σύζευξης της 18 με τα τριφαινυλοφώσφινο οξέα 5 και 6 δεν προχώρησε, σε αντίθεση με την αντίστοιχη αντίδραση της λουμινόλης (Κεφάλαιο 6), που έδωσε πολύπλοκο μίγμα προϊόντων επιβεβαιώνει την υπόθεση ότι τα όξινα πρωτόνια του υδράζιδο ομάδας της λουμινόλης είναι εκείνα που συμμετέχουν στην αντίδραση σύζευξης και όχι η άμινο ομάδα της.

7.3 Συνθετική προσέγγιση με χρήση βρωμο-αλκυλο-καρβοξυλικών οξέων ως ακυλιωτικά μέσα.

Λόγω των αποτυχημένων προσπαθειών απομόνωσης προϊόντος από τις αντιδράσεις ακυλίωσης της ένωσης **18** από τριφαινυλοφώσφινο παράγωγα οξέων που περιγράφηκαν παραπάνω, ακολουθήσαμε μια εναλλακτική πορεία, όπως φαίνεται στο σχήμα 31. Συγκεκριμένα, η ένωση **16** θα μπορούσε να προκύψει από την ένωση **25**, μέσω αντίδρασης πυρηνόφιλης υποκατάστασης από την τριφαινυλοφωσφίνη. Η ένωση **25**, θα μπορούσε με τη σειρά της να προκύψει μέσω αντίδρασης ακυλίωσης της ένωσης **18** με την ένωση **7**. Κατ' αυτόν τον τρόπο, η τριφαινυλοφωσφίνη εισάγεται μετά από την ακυλίωση, υποθέτοντας ότι έτσι ίσως αποφεύγεται ένας παράγοντας που παρεμποδίζει την απομόνωση προϊόντος ακυλίωσης.



Σχήμα 31. Ρετροσυνθετική πορεία των ενώσεων 3 και 4.

7.3.1. Μέσω αντίδρασης σύζευξης

Έχοντας ως στόχο την σύνθεση των ενώσεων **25** και **26** πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις σύζευξης της ένωσης **18**με τις εμπορικά διαθέσιμες ενώσεις**7** και **8**, αντίστοιχα, παρουσία *Ν*,*Ν*-δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμιδίου και 4διμεθυλαμινοπυριδίνης σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο, όμως δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός του επιθυμητού, αλλά και γενικά προϊόντων (σχήμα 32), όπως είχε παρατηρηθεί και παραπάνω (σχήμα 21), επιβεβαιώνοντας τη μειωμένη πυρηνοφιλικότητα της άμινο ομάδας της **18**.



Σχήμα 32. Αντίδραση σύζευξης της ένωσης 18. Συνθήκες: DCC, DMAP, DCM, rt, o/n

7.3.2. Μέσω αντίδρασης χλωριδίων οξέων

Η μειωμένη πυρηνοφιλικότητα της αμίνης του φθαλιμιδίου **18** που παρατηρήθηκε πιο πάνω, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι χρειάζονται δραστικότερες συνθήκες για την ακυλίωσή της, προκρίνοντας τη χρήση χλωριδίων οξέων. Έτσι, το οξύ **7** αντέδρασε με θειονυλοχλωρίδιο στους 80 °C για 3 ώρες προς σχηματισμό του ακυλοχλωριδίου **W**, ως ενδιάμεσο, το οποίο αντέδρασε χωρίς να απομονωθεί με την ένωση **18** παρουσία τριαιθυλαμίνης και πυριδίνης σε διχλωρομεθάνιο. Το μίγμα της αντίδρασης επεξεργάστηκε και καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης, οπότε παραλήφθηκε η ένωση **25** σε απόδοση μόλις 9% (σχήμα 33).



Σχήμα 33. Αντίδραση του φθαλιμιδίου 18 με τα χλωρίδια των οξέων 7 και 8. Συνθήκες: (α) SOCI₂, Δ, 3 h, (β) ΤΕΑ, πυριδίνη, DCM, rt, o/n

Παρακάτω δίνεται το φάσμα ¹Η NMR της ένωσης **25**, όπου παρατηρείται η χαρακτηριστική απλή κορυφή στα 9.56 ppm, όπου συντονίζεται το αμιδικό πρωτόνιο. Στα 8.72 ppmπαρατηρείται μια διπλή κορυφή, όπου συντονίζεται το πρωτόνιο σε όρθο θέση ως προς το αμίδιο, μια τριπλή κορυφή στα 7.60 ppm, στα οποία συντονίζεται το πρωτόνιο σε μέτα θέση και μια διπλή στα 6.77 ppm, που οφείλεται στο πρωτόνιο σε πάραθέση. Επίσης, τα πρωτόνια σε *α*-θέση ως προς το αμιδικό καρβονύλιο εμφανίζονται ως μια τριπλή στα 2.49ppm, ενώ αυτά δίπλα στο βρώμιο εμφανίζονται ως μια τριπλή στα 3.38ppm (εικόνα 18).



Εικόνα 18. Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 25 σε CDCl₃.

Αντίστοιχα αποτελέσματα έδωσε και το οξύ **8** υπό τις ίδιες συνθήκες. Με ανάλογο τρόπο πραγματοποιήθηκε η αντίδραση ακυλίωσης του πρόδρομου της λουμινόλης **18** από το ακυλοχλωρίδιο **Ζ**, προς σχηματισμό της ένωσης **26** σε απόδοση 23%. Παρόμοια εικόνα με αυτή της **25** έχει και το φάσμα ¹Η NMR της **26** (εικόνα 19).



Εικόνα 19. Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 26 σε CDCI_{3.}

7.4. Σύνθεση των ενώσεων στόχων 3 και 4.

Έχοντας συνθέσει τα ακυλιωμένα παράγωγα του φθαλιμιδίου **25** και **26**, διερευνήθηκε η εισαγωγή της τριφαινυλοφώσφινο ομάδας. Έτσι, πραγματοποιήθηκε αντίδραση πυρηνόφιλης υποκατάστασης του Br της ένωσης **25** από την τριφαινυλοφωσφίνη σε διαλύτη ακετονιτρίλιο υπό επαναρροή για 72h προς σχηματισμό της ένωσης **16** σε απόδοση 80% (σχήμα 34).



Σχήμα 34. Σύνθεση των ενώσεων στόχων 3 και 4. Συνθήκες: (α) PPh₃, MeCN, 80 °C, 72h, (β) NH₂NH₂·H₂O, EtOH, 100 °C, 3h.

Στο φάσμα ¹Η NMR της ένωσης **16** (εικόνα 20), στην περιοχή των 7.48-7.95 ppm παρατηρείται μια πολλαπλή κορυφή, όπου συντονίζονται τα πρωτόνια της τριφαινυλοφωσφίνης, καθώς μια πολλαπλήκορυφή στη περιοχή των 3.42–3.79 ppm όπου συντονίζονται τα πρωτόνια της μεθυλένο ομάδας δίπλα στην τριφαινυλοφωσφίνη.



Εικόνα 20. Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 16 σε CDCl₃.

Με αντίστοιχο τρόπο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της ένωσης **17** με απόδοση 53 % και φασματοσκοπικά δεδομένα παρόμοια με αυτά της ένωσης **16**.

Το τελευταίο στάδιο για την σύνθεση της τελικής ένωσης **3** περιλαμβάνει την αντίδραση υδραζινόλυσης του προϊόντος **16.** Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα,¹¹²η αντίδραση υδραζινόλυσης των φθαλιμιδίων πραγματοποιείται σε μία ώρα το πολύ, είτε με 1 eq ένυδρης υδραζίνης (N₂H₄•H₂O) και ήπια θέρμανση (έως 90 °C) δίνοντας το *N*-άμινο φθαλιμίδιο, είτε με περίσσεια ποσότητας N₂H₄•H₂O (έως 3 eq) υπό βρασμό προς σχηματισμό του φθαλυδραζιδίου. Έτσι, αντίδραση του φθαλιμιδίου **16** με περίσσεια N₂H₄•H₂O σε αιθανόλη υπό βρασμό για 3 ώρες, έδωσε, μετά από επεξεργασία και χρωματογραφία στήλης, το τελικό μιτοτροπικό παράγωγο της λουμινόλης **3** με απόδοση 38%.

Παρακάτω δίνονται τα φάσματα ¹Η και ¹³CNMR της τελικής ένωσης **3**. Στο φάσμα ¹Η-NMR της εικόνας 19, τα πρωτόνια της υδράζιδο ομάδας συντονίζονται ως μια απλή ευρεία κορυφή στα 11.47 ppm, ενώ το αμιδικό ως μια απλή στα 12.68 ppm. Ακόμη, το αρωματικό πρωτόνιο σε όρθο θέση ως προς την αμιδική ομάδα συντονίζεται στα 8.99 ppm ως μια διπλή κορυφή. Στην

περιοχή των 7.41-8.09 ppm παρατηρείται μια πολλαπλή κορυφή, όπου συντονίζονται τα πρωτόνια της τριφαινυλοφωσφίνης και αυτά του αρωματικού δακτυλίου της λουμινόλης που βρίσκονται σε μέτα και πάρα θέση ως προς το αμίδιο.Χαρακτηριστική είναι η πολλαπλή κορυφή που παρατηρείται στην περιοχή των 3.39-3.71 ppm, όπου συντονίζονται τα πρωτόνια της μεθυλένο ομάδας δίπλα στην τριφαινυλοφωσφίνη, καθώς και η τριπλή κορυφή στα 2.39 ppm, που αποδίδεται στην α-μεθυλένο ως προς το καρβοξύλιο ομάδα. Στο φάσμα ¹³CNMR της ίδιας ένωσης (εικόνας 22), διακρίνεται το σήμα της χημικής μετατόπισης του αμιδικού άνθρακα στα 175.67 ppm και οι χημικές μετατοπίσεις των καρβονυλικών ατόμων άνθρακα του φθαλυδραζιδίου στα 159.74και 154.90 ppm. Οι χημικές μετατοπίσεις στα 141.40 και 134.42 ppm οφείλονται στους αρωματικούς άνθρακες (5) και (7). Τα ισχυρά σήματα που εμφανίζονται στα 135.19, 133.61 και 130.61 ως διπλές κορυφές οφείλονται στους αρωματικούς άνθρακες της τριφαινυλοφωσφίνης σε πάρα, όρθοκαι μέταθέση αντιστοίχως. Οι αρωματικοί άνθρακες (8a), (8), (6), (4a) εμφανίζονται κατ'αντιστοιχία στα 128.24, 122.73, 119.82, 115.14 ppm, ενώ το ισχυρό σήμα που εμφανίζεται στα 118.31 ppm ως διπλή κορυφή οφείλεται στους άνθρακες της τριφαινυλοφωσφίνης σε ipso θέση. Ακόμη, ο άνθρακας δίπλα στην άμιδο ομάδα συντονίζεται στα 38.79 ppm και οι αλειφατικοί άνθρακες σε γ, β και α θέση ως προς την τριφαινυλοφωσφίνη συντονίζονται ως διπλές κορυφές στα 30.43, 22.70, 22.54 ppm αντιστοίχως. Τέλος, οι υπόλοιποι άνθρακες της αλειφατικής αλυσίδας συντονίζονται στην περιοχή των 29.00–25.40 ppm. Το φάσμα μάζας της 3 δίνει ισχυρό σήμα μοριακού ιόντος στο θετικό ιονισμό, λόγω του τριφαινυλοφώσφινο κατιόντος, στα 606.3 m/z.



Εικόνα 21. Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 3 σε CDCI_{3.}



Εικόνα 22. Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 3 σε CDCI₃.

Με μια μικρή διαφοροποίηση πραγματοποιήθηκε και η σύνθεση του έξυλοπαραγώγου **4**. Το φθαλιμίδιο **17**αντέδρασε με μεγαλύτερη περίσσεια υδατικού διαλύματος υδραζίνης σε διαλύτη αιθανόλη και ισχυρή θέρμανση στους 100 °C για 4h προς σχηματισμό της τελικής ένωσης **4** σε απόδοση 53%. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα της **4** είναι παρόμοια με αυτά της ένωσης **3**.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Συνθετική προσέγγιση μιτοτροπικών παραγώγων της λουμινόλης μέσω θειοακυλίωσης.

Στα προηγούμενα κεφάλαια περιγράφηκαν οι προσπάθειες σύνθεσης των επιθυμητών παραγώγων της λουμινόλης μέσω ακυλίωσης είτε αυτής είτε του πρόδρομου της, 3-αμινοφθαλιμιδίου, από τις οποίες μόνο η τελευταία έδωσε τις ενώσεις στόχους 3 και 4. Αυτό το κεφάλαιο, επικεντρώνεται στις προσπάθειες σύνθεσης μιτροτροπικών παραγώγων της λουμινόλης, όπου η λουμινόλη θα συνδέεται με το μιτοτροπικό κέντρο (τριφαινυλοφώσφινο κατιόν) μέσω μιας αλειφατικής αλυσίδας συνδεδεμένης με τη λουμινόλη μέσω θειοαμιδικού δεσμού και παρουσιάζονται κάποια πρώτα αποτελέσματα. Η θειοακυλίωση της λουμινόλης μπορεί να επιτευχθεί μέσω του ισοθειοκυανικού παραγώγου 29, όπου η 5-αμινο ομάδα της λουμινόλης μετατρέπεται από πυρηνόφιλο κέντρο σε ηλεκτρονιόφιλο, το οποίο θα μπορούσε να αντιδράσει με κάποιο πυρηνόφιλο, όπως αμίνες. Συγκεκριμένα, οι τελικές ενώσεις 30 και 31 θα μπορούσαν να προκύψουν από αντίδραση της ένωση 29 μέσω αντίδρασης πυρηνόφιλης προσθήκης των αμινών 38 ή 42. Οι αμίνες αυτές προέρχονται από αντίδραση πιπεραζίνης με τα αντίστοιχα βρώμο- ή καρβόξυάλκυλοτης τριφαινυλοφώσφινο κατιόντα 39 και 5 (σχήμα 35).



Σχήμα 35. Γενικό ρετροσυνθετικό σχήμα των ενώσεων στόχων 30 και 31, μέσω θειοακυλίωσης της λουμινόλης.

8.1 Συνθετική προσέγγιση της ισοθειοκυανικής ένωσης 29.

Για τη σύνθεση της ισοθειοκυανικής ένωσης **29**, ακολουθήθηκε πειραματική πορεία που αναφέρεται στη βιβλιογραφία.^{113,117} Έτσι, η λουμινόλη αντέδρασε με θειοφωσγένιο παρουσία τριαιθυλαμίνης σε ξηρό *N*,*N*'-διμεθυλοφορμαμίδιοστους 0 °C, αλλά δεν σχηματίστηκε προϊόν. Η ίδια αντίδραση επαναλήφθηκε παρουσία τριαιθυλαμίνης σε εξηρό τετραϋδροφουράνιο στους 0 °C προς σχηματισμό μίγματος 2 ενώσεων (σχήμα 36). Αρχικά, υποθέσαμε πως επρόκειτο για το
ισοθειοκυανικό παράγωγο **29** και το κυκλοποιημένο ισομερές **32**. Έγιναν προσπάθειες διαχωρισμού του μίγματος, αλλά λόγω εξαιρετικά χαμηλής διαλυτότητας στους κοινούς οργανικούς διαλύτες, ο διαχωρισμός ήταν αδύνατος.



Σχήμα 36. Αντίδραση της λουμινόλης και της ισολουμινόλης με θειοφωσγένιο. Συνθήκες: (α) CSCI₂, TEA, THF, 0 °C- r.t, o/n.

Το μίγμα εξετάστηκε κατ' αρχήν με φασματοσκοπία μέσου υπερύθρου (IR) για να ταυτοποιηθεί η χαρακτηριστική ισχυρή απορρόφηση στην περιοχή των 2100 cm⁻¹ που οφείλεται στη δόνηση της ισοθειοκυανικής ομάδας, γεγονός που δεν επαληθεύτηκε (εικόνα 23). Αυτό, σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα φασματοκοπικά δεδομένα που παρατίθενται παρακάτω (φάσματα NMR και MS) οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το μίγμα αποτελείται από τα κυκλοποιημένα παράγωγα **32** και **33** σε αναλογία περίπου 2:1. Επανάληψη της αντίδρασης σε μικρότερη κλίμακα έδωσε τα ίδια προϊόντα, σε διαφορετική όμως αναλογία (5:1), γεγονός που

υποδεικνύει ότι: α) η ισοθειοκυανική ένωση αμέσως μετά το σχηματισμό της προσβάλλεται από το γειτονικό οξυγόνο του υδραζιδικού καρβονυλίου στην ενολική μορφή, δίνοντας την κυκλοποιημένη ένωση 32 και β) οι συνθήκες που οδηγούν στην καρβόνυλο-κυκλοποιημένη ένωση 33 είναι ασαφείς και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί μια παρόμοια περίπτωση όπου αντίδραση αρωματικής αμίνης με θειοφωσγένιο δίνει μίγμα ισοθειοκυανικού και ισοκυανικού παραγώγου, χωρίς να δίνεται μια πειστική εξήγηση για το σχηματισμό του δεύτερου. Ειδικότερα, υποστηρίζεται ότι οι ισοθειοκυανιούχες ομάδες (N=C=S) είναι δραστικές ενώσεις και μπορούν να υδρολυθούν ταχέως όταν εκτεθούν στην υγρασία και γενικά σε υδατικό περιβάλλον, με αποτέλεσμα то θείο να αντικαθίσταται από то οξυγόνο.113,116,123,127

Αντιθέτως, σε διερευνητική αντίδραση της ισολουμινόλης **34** με θειοφωσγένιο στις ίδιες συνθήκες, το αποτέλεσμα ήταν η ισοθειοκυανική ένωση **35** με απόδοση 86%, δίνοντας ένα ισχυρό σήμα δόνησης ισοθειοκυανικής ομάδας στο φάσμα IR στους 2069 cm⁻¹ (σχήμα 34,εικόνα 21).



Εικόνα 23. Φάσματα ΙR των προϊόντων των αντιδράσεων θειοφωσγενίου με τη λουμινόλη (μίγμα 32 και 33, κόκκινο) και την ισολουμινόλη (34, μαύρο).

Στο φάσμα ¹Η NMR του μίγματος των ενώσεων **32** και **33** (εικόνα 24) παρατηρούνται 4 απλές κορυφές που συντονίζονται τα αμιδικά Ν-Η στην περιοχή 11-14 ppm, 2 για κάθε ένωση, με βάση τη σχετική ολοκλήρωσή τους. Το γεγονός ότι στο φάσμα H,H-COSY δεν διακρίνεται σύζευξη μεταξύ τους, υποδεικνύει ότι καμία από τις 2 ενώσεις του μίγματος δεν περιέχει την υδράζιδο ομάδα του φθαλαζινικού δακτυλίου στη μορφή CO-NH-NH-CO (όπως στην 29), προκρίνοντας μάλλον την ενολική της μορφή (όπως στις ενώσεις 32, 33). Ακόμη, από το συνδυασμό των φασμάτων ¹³CNMR αυτού του μίγματος (32/33 2:1), του μίγματος με διαφορετική αναλογία που αναφέρθηκε πιο πάνω (32/33 5:1) αλλά και το φάσμα του προϊόντος της αντίδρασης που παρατίθεται στη βιβλιογραφία (το οποίο είναι ταυτόσημο με το μίγμα μας, αν και υποστηρίζεται ότι πρόκειται για το 29), έγινε εφικτή η ταυτοποίηση των σημάτων που αντιστοιχούν σε κάθε ένωση του μίγματος. Έτσι, στην ένωση 32 αποδίδονται οι κορυφές στα 179.47 (C=S), 158.94 (C=O) και 147.57 (C=N) ppm, ενώ στην ένωση 33 οι κορυφές στα 159.05 (C=O), 148.45 (C=N) και 146.71 (N(C=O)O). Στο φάσμα IR, πέρα από τη μη ύπαρξη N=C=S δόνησης, διακρίνεται και μία κορυφή στους 1747 cm⁻¹, που αποδίδεται στη C=O δόνηση της κυκλικής ουρεθάνης της 33. Τέλος, στο φάσμα μάζας του ίδιου μίγματος (εικόνα 26) παρατηρούνται 2 κύριες κορυφές, μια στα 202.2 m/z που οφείλεται στο μοριακό ιόν της ένωσης 33 και μια στα 218.1 m/z που οφείλεται στο μοριακό ιόν του κυκλοποιημένου παραγώγου 32.



Εικόνα 24. Φάσμα ¹Η NMR του μίγματος των ενώσεων 32 και 33 σε DMSO-d6. Πλαίσιο: Η,Η-COSY φάσμα (περιοχή αμιδικών NH).



Εικόνα 25. Φάσμα ¹³C NMR του μίγματος των ενώσεων 32 και 33 σε DMSO-d6.



Εικόνα 26. Εικόνα 18. Φάσμα μάζας του μίγματος των ενώσεων 32 και 33.

Θεωρώντας ότι ο άνθρακας της θειοκαρβόνυλο ομάδας αποτελεί δραστικό ηλεκτρονιόφιλο κέντρο σε πυρηνόφιλες αντιδράσεις προσθήκης, υποθέσαμε ότι η ένωση 32 (όπως και η 33) θα αντιδρούσε με ένα πυρηνόφιλο δίνοντας τα θειοκαρβόνυλο (και καρβόνυλο) παράγωγα που θα έδιναν οι αντίστοιχες ισο(θειο)κυανικές ενώσεις. Έτσι, πραγματοποιήθηκε μια δοκιμαστική αντίδραση πυρηνόφιλης προσθήκης μιας δευτεροταγούς αμίνης, της πυρρολιδίνης. Το μίγμα των ενώσεων 32 και 33 (σε αναλογία 5:1) αντέδρασε με περίσσεια πυρρολιδίνης σε 1,4-διοξάνη για 24 h, δίνοντας, μετά από υποτυπώδη επεξεργασία (εκχύλιση), το μίγμα των παραγώγων 36 και 37(σχήμα 37), το οποίο δεν επιχειρήθηκε να καθαριστεί περαιτέρω.



Σχήμα 37. Αντίδραση πυρηνόφιλης προσθήκης. Συνθήκες: πυρρολιδίνη, 1,4-διοξάνη, r.t, o/n.

Στο φάσμα ¹HNMR του μίγματος της αντίδρασης φαίνεται ότι τα αντιδρώντα έχουν καταναλωθεί πλήρως. Το σετ των κύριων αρωματικών κορυφών στα 9.6 (d), 7.8 (t) και 7.6 (d) αποδίδεται στο θειοκαρβόνυλο παράγωγο **36**, ενώ αυτό των ασθενέστερων στα 8.8 (d), 7.8 (κρυμμένη) και 7.4 (d) στο καρβόνυλο παράγωγο **37**, όντας παρόμοιο με αυτό των αντίστοιχων άκυλο παραγώγων που είδαμε στα προηγούμενα κεφάλαια (π.χ. ένωση **13**, σχήμα 18).

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι παρόλο που η ισοθειοκυανική ένωση δεν μπορεί να απομονωθεί, η κυκλοποιημένη θειουρεθάνη **32** αντιδρά εξίσου αποτελεσματικά με πυρηνόφιλα, δίνοντας τις επιθυμητές θειοκαρβόνυλο ενώσεις. Η αντίδραση όμως της λουμινόλης με θειοφωσγένιο χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση ως προς το σχηματισμό του παραπροϊόντος της κυκλοποιημένης ουρεθάνης **33**.

8.2. Συνθετική προσέγγιση των αλκυλο τριφαινυλοφωσφινο παραγώγων της πιπεραζίνης.

Παράλληλα με τη διερεύνηση της θειοκαρβονυλίωσης της λουμινόλης, επιχειρήθηκε η σύνθεση των άλκυλο παραγώγων της τριφαινυλοφωσφίνης που

θα προσβάλουν πυρηνόφιλα τη θειοκαρβόνυλο ομάδα της ένωσης **32**, προς σχηματισμό των ενώσεων στόχων **30** και **31** (σχήμα 35).

8.2.1. Συνθετική προσέγγιση της ένωσης 30.

Πρωταρχικός στόχος για την σύνθεση της ένωσης **30** τέθηκε η σύνθεση του παραγώγου **38**. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία,^{115,112,134} πραγματοποιήθηκε αντίδραση πυρηνόφιλης υποκατάστασης S_N2 του βρωμίου του εμπορικά διαθέσιμου διβρωμοδεκανίου **41** σε μικρή (1.5 eq) και μεγάλη περίσσεια (8 eq) από την τριφαινυλοφωσφίνη σε διαλύτη τολουόλιο υπό αναρροή για 72h προς σχηματισμό της ένωσης **39** ως μίγμα με το διϋποκατεστημένο προϊόν **40**, το οποίο δεν μπόρεσε να καθαριστεί περαιτέρω, σε απόδοση 35%(Σχήμα 38).



Σχήμα 38. Αντίδραση πυρηνόφιλης προσθήκης. Συνθήκες: (α) MePh, 110 °C, 72h, (β) piperazine (3eq), K₂CO₃, MeCN, 70 °C, 24h.

Στο φάσμα μάζας του μίγματος της αντίδρασης (εικόνα 27) διακρίνεται το μοριακό ιόν της **39** (481 m/z), το οποίο παρουσιάζει πολλαπλότητα βρωμιωμένου παραγώγου.



Εικόνα 27. Φάσμα μάζας του μίγματος της αντίδρασης.

Η υποκατάσταση των δύο ατόμων βρωμίου από την τριφαινυλοφωσφίνη, που οδήγησε στο σχηματισμό του μονοϋποκατεστημένουπαραγώγου **39** σε μικρή απόδοση, θα μπορούσε λογικά να αποτραπεί με χρήση μεγαλύτερης περίσσειας του διβρωμοδεκανίου **41**.

Εφόσον δεν μπόρεσε να καθαριστεί περαιτέρω το μονουποκατεστημένο προϊόν **39** με τις γνωστές μεθόδους (καταβύθιση, ανακρυστάλλωση, χρωματογραφία στήλης) και γνωρίζοντας ότι μόνο αυτό (και όχι το **40**) θα αντιδρούσεμε την πιπεραζίνη, ακολούθησε η προσπάθεια σύνθεσης του παραγώγου **30** με το παραπάνω μίγμα των **39** και **40**. Το ακατέργαστο προϊόν **39** αντέδρασε με πιπεραζίνη παρουσίας ανθρακικού ασβεστίου σε διαλύτη ακετονιτρίλιο υπό θέρμανση για 24h (σχήμα 38). Τελικά, δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός του επιθυμητού, αλλά και γενικά προϊόντων. Πιθανώς, η τριφαινυλοφωσφίνη παρεμποδίζει στερεοχημικά την υποκατάσταση του βρωμίου από την άμινο ομάδα της πιπεραζίνης, γεγονός που δεν επιβεβαιώνεται από την βιβλιογραφία,¹³³ αλλά η παραπάνω αντίδραση απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

8.2.2. Συνθετική προσέγγιση της ένωσης 31.

Δεδομένου ότι η αντίδραση πυρηνόφιλης υποκατάστασης της ένωσης **39** από την πιπεραζίνη δεν οδήγησε σε προϊόν, διερευνήθηκε ένας εναλλακτικός τρόπος σύνθεσης του πυρηνόφιλου παραγώγου της πιπεραζίνης μέσω αντίδρασης ακυλίωσης (σχήμα 39). Συγκεκριμένα,η σύνθεση της τελικής ένωσης **31** θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μέσω αντίδρασης του ισοθειοκυανικού παραγώγου **29** με την ένωση **42**, η οποία θα μπορούσε να προκύψει μέσω αντίδρασης ακυλίωσης της πιπεραζίνης από το οξύ **5** (σχήμα 35).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύζευξης της πιπεραζίνης με το οξύ **5** παρουσία EDC και HOBt σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο για 120 ώρες προς σχηματισμό του άκυλο παραγώγου **42** σε απόδοση 13% (σχήμα 39). Η χαμηλή απόδοση του επιθυμητού προϊόντος οφείλεται στο σχηματισμό του διυποκατεστημένου παραγώγου της πιπεραζίνης **43** σε απόδοση 18%.



Σχήμα 39. Σύνθεση της ένωσης 42. Συνθήκες: (α) i) EDC, HOBt, piperazine (4 eq), DCM, r.t., 120h, ii) EDC, piperazine (10 eq), πυριδίνη (0.8 eq), DCM, ^o0 C- r.t., 120h.

Παρακάτω δίνεται το φάσμα ¹Η και ¹³C NMR της ένωσης **42**. Στο φάσμα ¹Η (εικόνα 28) διακρίνεται η χαρακτηριστική απλή κορυφή στα 7.89 ppm που συντονίζεται το πρωτόνιο της άμινο ομάδας. Ακόμα, τα αιθυλικά πρωτόνια της ομάδας της πιπεραζίνης συντονίζονται ως μια πολλαπλή στη περιοχή των 3.96-3.69 ppm και ως μια τριπλή κορυφή στα 3.03 ppm. Τα πρωτόνια της μεθυλένο ομάδας που βρίσκεται δίπλα στην τριφαινυλοφωσφίνη συντονίζονται στη περιοχή των 3.59-3.30 ppm ως μια πολλαπλή καιτέλος, παρατηρείται μια τριπλή κορυφή στα 2.19 ppm που αποδίδεται στα πρωτόνια σε α-θέση ως προς την καρβόνυλο ομάδα. Στο φάσμα ¹³C της ίδιας ένωσης (εικόνα 29), διακρίνεται το σήμα της χημικής μετατόπισης του αμιδικού άνθρακα στα 171.53 ppm. Οι χημικές μετατοπίσεις στα 45.94, 43.54, 43.29, 42.41 ppm οφείλονται στους άνθρακες της πιπεραζίνης, ενώ ο άνθρακας δίπλα στην άμιδο ομάδα συντονίζεται στα 38.08 ppm και αυτός σε β-θέση ως προς την καρβόνυλο ομάδα στα 32.85 ppm.



Εικόνα 28. Φάσμα ¹Η NMR της ένωσης 42.



Εικόνα 29. Φάσμα 13C NMR της ένωσης 42.

Με σκοπό την αύξηση της απόδοσης, η ίδια αντίδραση επαναλήφθηκε με περίσσεια πιπεραζίνης (10 eq) παρουσία EDC και πυριδίνης στους 0 °C σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο για 72 ώρες (σχήμα 39), αλλά η απόδοση της αντίδρασης παρέμεινε ίδια, με αποτέλεσμα να επιβεβαιώνεται η στερεοχημική παρεμπόδιση της ογκώδους τριφαινυλοφωσφίνης.

Το ακυλιωμένο παράγωγο της πιπεραζίνης **42** χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο βήμα για την σύνθεση του τελικού προϊόντος μέσω αντίδρασης πυρηνόφιλης προσθήκης του στο μίγμα του ισοθειοκυανικού και ισοκυανικού παραγώγου, **32** και **33** αντίστοιχα. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν 3 δοκιμαστικές αντιδράσεις του μίγματος των **32** και **33** με το παράγωγο **42**,σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο για 24h και 48h και σε διαλύτη *N*,*N*-διμεθυλοφορμαμίδιο για 24h (σχήμα 40).



Σχήμα 40. Αντίδραση πυρηνόφιλης προσθήκης. Συνθήκες(α)i) DCM, rt, 24h, ii) DCM, rt, 48h, iii) DMF, rt, 24h.

Υπό τις συνθήκες που πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις, παραλήφθηκαν μίγματα προϊόντων, εκ των οποίων κανένα δεν μπόρεσε να απομονωθεί και να ταυτοποιηθεί. Αυτή η αντίδραση χρίζει περαιτέρω μελέτη ως προς τις συνθήκες πραγματοποίησης της και τα αντίστοιχα προϊόντα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

9.1 Γενικό Πειραματικό Μέρος

9.1.1 Αντιδραστήρια και διαλύτες

Η προμήθεια των αντιδραστηρίων και των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν έγινε από τις εταιρίες Sigma-Aldrich, Fluka, Merck και AlfaAeasar. Οι διαλύτες τετραϋδροφουράνιο, διοξάνη και διαιθυλαιθέρας αποστάζονταν από μεταλλικό νάτριο παρουσία βενζοφαινόνης υπό αργό πριν από κάθε χρήση. Οι διαλύτες τολουόλιο, ακετονιτρίλιο, διχλωρομεθάνιο, τετραχλωράνθρακας, διμεθυλφορμαμίδιο αποστάζονταν από πεντοξείδιο του φωσφόρου υπό αργό και διατηρούνταν σε φιάλη τύπου Schlenk με μοριακά κόσκινα διαμέτρου 4Å. Οι συμπυκνώσεις των διαλυμάτων γίνονταν υπό ελαττωμένη πίεση σε περιστροφικό εξατμιστήρα.

9.1.2 Όργανα και διατάξεις

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR ¹H και ¹³C) ελήφθησαν σε φασματογράφο Varian Mercury 200MHz. Οι δευτεριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν CDCl₃, DMSO-d₆ και CD₃OD. Οι χημικές μετατοπίσεις των φασμάτων NMR εκφράζονται σε ppm, ενώ η σειρά παρουσίασης των δεδομένων των χημικών μετατοπίσεων στα φάσματα ¹H NMR είναι η εξής: αριθμός πρωτονίων, πολλαπλότητα, σταθερές σύζευξης J σε Hz και ταυτοποίηση κορυφών. Η ταυτοποίηση των κορυφών έγινε βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων, σύγκρισης με πρόδρομες ενώσεις, αλλά και υπολογισμών με τη χρήση προγραμμάτων πρόβλεψης φασμάτων NMR.

Τα φάσματα μάζας ελήφθησαν σε φασματόμετρο τύπου LTQXL/ORBITRAP-LC/MS της ThermoScientific όπου ο ιονισμός των ενώσεων έγινε μέσω της τεχνικής ηλεκτροψεκασμού (ESI, Electron Spray Ionization). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ακετονιτρίλιο και μεθανόλη καθαρότητητας HPLC.

9.1.3 Χρωματογραφική ανάλυση και χρωματογραφικός καθαρισμός

Οι πορείες των αντιδράσεων και η σειρά έκλουσης των ουσιών κατά τη διενέργεια χρωματογραφίας στήλης ελέγχθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), για την οποία χρησιμοποιήθηκαν φύλλα αλουμινίου 0.2 mm επιστρωμένα με silica gel 60 και φθορίζοντα δείκτη F254 (Merck, Art. 5714). Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκε επίσης για την επιβεβαίωση της καθαρότητας διαφόρων προϊόντων (σε συνδυασμό με 1Η και 13C NMR). Σε περίπτωση που δεν σημειώνεται διαφορετικά, τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων λεπτής στοιβάδας είναι τα ίδια που χρησιμοποιήθηκαν στη χρωματογραφία στήλης και αναφέρονται χωριστά για κάθε προϊόν. Χωριστά για κάθε προϊόν/ουσία αναφέρεται και ο παράγοντας κατακράτησης (Rf). Για την εμφάνιση των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιήθηκαν: λυχνία UV (λ=254 nm και 365 nm) ή/και αιθανολικό διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος 7.5% ή/και όξινο διάλυμα p-ανισαλδεϋδης.

Ο καθαρισμός των προϊόντων που παρασκευάστηκαν πραγματοποιήθηκε μέσω απόσταξης υπό ελαττωμένη πίεση ή/και με χρωματογραφία στήλης (column chromatography). Η έκλουση έγινε με εφαρμογή πίεσης αέρα (flash column chromatography). Στις στήλες χρησιμοποιήθηκε silica gel της Merck 60 (230-400 mesh). Τα συστήματα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται χωριστά για κάθε προϊόν.

9.2 Συνθετικές Μέθοδοι – Χαρακτηρισμός Ενώσεων.

Σύνθεση του (10-καρβοξυενδεκυλο)τριφαινυλοφώσφινο βρωμιδίου 5.



Σε διάλυμα του 11-βρωμοενδεκανοϊκού οξέος (3.18 g, 12 mmol) σε ξηρό ακετονιτρίλιο (20 mL), προστέθηκε τριφαινυλοφωσφίνη (3 g, 11.43 mmol) σε προξηραμένη δίλαιμη σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 100 mL και το μίγμα έβρασε υπό επαναρροή (reflux) για 18 ώρες υπό ροή αργού. Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώθηκε μερικώς υπό ελαττωμένη πίεση. Τελικά, το προϊόν καταβυθίστηκε από οξικό αιθυλεστέρα.

Λευκό στερεό: 5.22g, απόδοση 87%

R_f(MeOH/DCM: 10/90) = 0.48

¹HNMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 8.82 (bs, 1H, COO*H*), 7.80 – 7.60 (m, 15H, Ar-H), 3.81 – 3.48 (m, 2H, C*H*₂P⁺Ph₃), 2.36 (t, *J*= 7.2 Hz, 2H, C*H*₂COOH), 1.79 – 1.44 (m, 6H, C*H*₂), 1.38 – 1.04 (m, 10H, C*H*₂).

¹³CHMR (50 MHz, CDCl₃) δ : 177.66 (C=O), 135.10 (d, *J*= 2.8 Hz, P⁺Ph₃para), 133.52 (d, *J*= 9.9 Hz, P⁺Ph₃ortho), 130.53 (d, *J*= 12.5 Hz, P⁺Ph₃meta), 118.09 (d, *J*= 85.9 Hz, P⁺Ph₃ ipso), 34.40 (CH₂COOH), 30.28 (d, *J*= 15.9 Hz, CH₂CH₂CH₂P⁺Ph₃), 24.65 (CH₂CH₂COOH), 22.56 (d, *J* = 50.7 Hz, CH₂P⁺Ph₃), 22.44 (d, *J* = 4.5 Hz, CH₂CH₂P⁺Ph₃).

³¹PNMR (81 MHz, CDCl₃) δ: 25.09

ES-MSm/z για C₂₉H₃₆O₂P[M]⁺: υπολογίστηκε 447.2, βρέθηκε 447.2.

Σύνθεση του (5-καρβοξυεξυλο)τριφαινυλοφώσφινο βρωμιδίου 6.



Σε διάλυμα 6-βρωμοεξανοϊκού οξέος (1.02 g, 5.25 mmol) σε ξηρό ακετονιτρίλιο (10 mL), προστέθηκε τριφαινυλοφωσφίνη (1.31 g, 5 mmol) σε προξηραμένη

δίλαιμη σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 50 mL και το μίγμα αφέθηκε να βράσει υπό επαναρροή (reflux) για 18 ώρες υπό ροή αργού. Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, συμπυκνώθηκε μερικώς υπό ελαττωμένη πίεση και το προϊόν παραλήφθηκε από καταβύθιση με οξικό αιθυλεστέρα.

Λευκό στερεό: 1.82, απόδοση 80%.

R_f(MeOH/DCM: 10/90) = 0.17

¹HNMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 8.46 (bs, 1H, COO*H*), 7.91 – 7.57 (m, 15H, Ar-H), 3.61 (m, 2H, C*H*₂P⁺Ph₃), 2.36 (t, *J*= 6.4 Hz , 2H, C*H*₂COOH), 1.77 – 1.48 (m, 6H, C*H*₂).

¹³CHMR (50 MHz, CDCl₃) δ : 176.09 (C=O), 135.21 (d, *J*= 2.8 Hz, P⁺Ph₃para), 133.66 (d, *J*= 10.0 Hz, P⁺Ph₃ortho), 130.65 (d, *J* = 12.5 Hz, P⁺Ph₃meta), 118.11 (d, *J* = 86.0 Hz, P⁺Ph₃ipso), 34.25 (CH₂COOH), 29.58 (d, *J* = 16.2 Hz, CH₂CH₂CH₂P⁺Ph₃), 22.55 (d, *J* = 52.1 Hz, CH₂P⁺Ph₃), 21.99 (d, *J* = 4.1 Hz, CH₂CH₂P⁺Ph₃).

³¹PNMR (81 MHz, CDCl₃) δ: 25.14

ES-MSm/z για $C_{24}H_{26}O_2P^+[M]^+$: υπολογίστηκε 377.2, βρέθηκε 377.2.

Σύνθεση του (11-((2,5-διοξοπυρρολιδιν-1-υλο)οξυ)-11οξοενδεκυλο)τριφαινυλοφώσφινο βρωμιδίου **10.**



Σε προξηραμένη υπό ροή αργού σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 100 mL προστέθηκαν διαδοχικά η ένωση **5** (200 mg, 0.37 mmol), *N*-υδροξυσουκινιμίδιο (87.3 mg, 0.76 mmol) και υδροχλωρικό 1-αιθυλο-3-(3διμεθυλαμινοπροπυλο)καρβοδιιμίδιο (145.4 mg, 0.76 mmol). Στη συνέχεια προστέθηκε ως διαλύτης μίγμα ξηρού διχλωρομεθάνιου / τετραυδροφουράνιου με αναλογία 1/1 (20 mL) και το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση σε ατμόσφαιρα αργού για 24 ώρες. Ακολούθησε συμπύκνωση του μίγματος της αντίδρασης, διάλυση του υπολλείμματος σε διχλωρομεθάνιο (50 mL) και εκπλύσεις της οργανικής φάσης με νερό (3 x 20 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε με θειικό μαγνήσιο, συμπυκνώθηκε και καθαρίστηκε από χρωματογραφία στήλης (Μεθανόλη / διχλωρομεθάνιο: 2/98, 4/96, 8/92, 10/90).

Υποκίτρινο κολλώδες στερεό: 192 mg,

απόδοση: 82%

R_f (MeOH/DCM: 10/90) = 0.17

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 7.86 – 7.44 (m, 15H, Ar-H), 3.59 – 3.36 (m, 2H, CH₂P⁺Ph₃), 2.75 (s, 4H, COCH₂CH₂CO), 2.45 (t, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂COOH), 1.66 – 1.37 (m, 6H, CH₂), 1.32 – 0.98 (m, 10H, CH₂).

¹³C HMR (50 MHz, CDCl₃) δ : 169.65 (C=O), 168.88 (C=O), 135.30 (d, *J* = 2.5 Hz, P⁺Ph₃ para), 133.69 (d, *J* = 10.0 Hz, P⁺Ph₃ ortho), 130.74 (d, *J* = 12.5 HzP⁺Ph₃ meta), 118.28 (d, *J* = 85.9 Hz, P⁺Ph₃ ipso), 31.02 (CH₂CO), 30.53 (d, *J* = 15.8 Hz, CH₂CH₂CH₂P⁺Ph₃), 24.63 (CH₂CH₂CO), 22.65 (d, *J* = 50.2 Hz, CH₂P⁺Ph₃), 22.66 (d, *J* = 3.7 Hz, CH₂CH₂P⁺Ph₃).

³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃) δ: 24.99

ES-MSm/z για $C_{33}H_{39}NO_4P[M]^+$: υπολογίστηκε 544.3, βρέθηκε 544.3.

Σύνθεση του (6-((2,5-διοξοπυρρολιδιν-1-υλο)οξυ)-6οξοεξυλο)τριφαινυλοφώσφινο βρωμιδίου **11.**



Σε προξηραμένη σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 100 mL προστέθηκαν διαδοχικά η ένωση **6** (300mg, 0.65 mmol), *N*-υδροξυσουκινιμίδιο (250mg, 1,3 mmol) και υδροχλωρικό 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)καρβοδιιμίδιο (149 mg, 1,3mmol) υπό ροή αργού. Στη συνέχεια προστέθηκε ξηρός τετραχλωράνθρακας (20 mL) και το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση σε ατμόσφαιρα αργού για 24 ώρες. Ακολούθησε συμπύκνωση του μίγματος της αντίδρασης, διάλυση του υπολείμματος σε διχλωρομεθάνιο (60 mL) και εκπλύσεις της οργανικής φάσης με νερό (3 x 20 mL). Η οργανική φάση ξηράθηκε με θειικό μαγνήσιο, συμπυκνώθηκε και καθαρίστηκε από χρωματογραφία στήλης (Μεθανόλη / διχλωρομεθάνιο: 2/98, 4/96, 8/92, 10/90).

Υποκίτρινο κολλώδες στερεό: 98mg, απόδοση: 27%

R_f (MeOH/DCM: 10/90) = 0.17

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 7.86 – 7.40 (m, 15H, Ar-H), 3.50 – 3.25 (m, 2H, CH₂P⁺Ph₃), 2.57 (s, 4H, COCH₂CH₂CO), 2.23 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂COOH), 1.75 – 1.34 (m, 6H, CH₂).

³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃) δ: 25.00

ES-MSm/z για $C_{28}H_{29}NO_4P[M]^+$: υπολογίστηκε 474.2, βρέθηκε 474.2.

Σύνθεση του (11-αιθοξυ-11-οξοεντεκυλο)- τριφαινυλοφώσφινο βρωμιδίου 12.



Σε προξηραμένη υπό ροή αργού σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 50 mL προσαρμοσμένη σε διάταξη Dean-Stark προστέθηκε το οξύ **5** (500 mg, 0.94 mmol) και καταλυτική ποσότητα πυκνού θεϊικού οξέος σε μίγμα διαλυτών τολουόλιο/αιθανόλη αναλογίας 1/1. Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να αναδεύεται στους 90 °C υπό επαναρροή (reflux) υπό ατμόσφαιρα αργού για 18 ώρες. Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης συμπυκνώθηκε υπό κενό και το υπόλειμμα διαλύθηκε σε οξικό αιθυλεστέρα (40 mL) και εκπλύθηκε από υδατικό διάλυμα ανθρακικού νατρίου1M (3x 15 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε με θειικό μαγνήσιο,συμπυκνώθηκε υπό ελαττωμένη πίεση και τελικά το προϊόν παραλήφθηκε ύστερα από εναιώρηση του οξέος **5** από οξικό αιθυλεστέρα, διήθηση και συμπύκνωση του υπολείμματος υπό κενό.

Καφέ κολλώδες στερεό: 446.3 mg, απόδοση: 85%

R_f(MeOH/DCM: 10/90) = 0.85

¹HNMR (200 MHz,CDCl₃) δ: 8.05 – 7.50 (m, 15H, Ar-H), 4.33 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.20 – 3.62 (m, $CH_2P^+Ph_3$), 2.25 (t, J = 7.5 Hz, 2H, CH_2COOH), 1.67 – 1.50 (m, 1H, CH_2), 1.42 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.30 – 1.10 (m, 10H, CH_2). ES-MSm/z για $C_{31}H_{40}O_2P^+[M]^+$:υπολογίστηκε 475.2, βρέθηκε 475.1.

Σύνθεση του 11-βρωμο-Ν-(1,4-διοξο-2,3-διυδροφθαλαζιν-5-υλο)ενδεκαναμιδίου **13.**

(απομόνωση ως μίγμα με 11-βρωμοενδεκανοϊκό οξύ).



Σε προξηραμένη υπό ροή αργού σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 100 mL προστέθηκε το 11-βρωμοενδεκανοϊκό οξύ (500 mg, 1.88 mmol) και θειονυλοχλωρίδιο(27 mL, 377 mmol). Το μίγμα έβρασε υπό επαναρροή (reflux) για 3h υπό αργό και στη συνέχεια αποστάχθηκε υπό κενό σε θερμοκρασία δωματίου. Στο υπόλειμμα προστέθηκε στάγδην στους 0 °C αιώρημα λουμινόλης (267 mg, 1.58 mmol) και τριαιθυλαμίνης (381 mg, 3.77 mmol) σε διχλωρομεθάνιο (20 mL) και το μίγμα αφέθηκε να αναδεύεται για 24h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκπλυση του μίγματος της αντίδρασης με νερό και η οργανική φάση ξηράνθηκε με θειικό μαγνήσιοκαι συμπυκνώθηκε. Το προϊόν που παραλήφθηκε ύστερα από χρωματογραφία στήλης (x3) ταυτοποιήθηκε ως μίγμα των **13** και 11-βρωμοενδεκανοϊκού οξέος σε αναλογία 1/0.6, (Μεθανόλη / διχλωρομεθάνιο: 2/98, 4/96, 8/92, 10/90).

Καφέ κολλώδες στερεό: 224 mg, απόδοση της ένωσης 5: 18%

R_f(MeOH/DCM: 2/98) = 0.65

¹HNMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 13.10 (bs, 1H, NH), 11.52 (bs, 2H, NH), 8.88 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-6), 7.59 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-7), 7.41 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H-8), 3.40 (t, J = 6.7 Hz, 2H+2H*, CH₂Br), 2.38-2.28 (m, 2H+2H*, CH₂CO), 1.91-1.78 (m, 2H+2H*, CH₂CH₂Br), 1.72-1.55 (m, 2H+2H*, CH₂CH₂CO), 1.50-1.20 (m, 12H+12H*, CH₂).

¹³C HMR (50 MHz, CDCl₃) δ: 179.58* (COO), 172.26 (NHCO), 162.70 (C-1), 154.63 (C-4), 141.08 (C-5), 135.54 (C-7), 124.96 (C-8a), 122.63 (C-5a), **11**8.15 (C-6), 113.25 (C-8), 38.42 (CH₂CONH), 34.19 (CH₂Br), 34.19* (CH₂Br), 34.12* (CH₂COO), 32.91 (CH₂CH₂Br), 32.91* (CH₂CH₂Br), 29.80, 29.70, 29.63, 29.45, 29.40, 29.29*, 29.13*, 28.95*, 28.83*, 28.34, 28.25*, 25.16 (CH₂CH₂CO), 24.78* (CH₂CH₂COOH).

*Κορυφές που αποδίδονται στο 11-βρωμοενδεκανοϊκό οξύ.

ES-MSm/z για $C_{19}H_{27}BrN_3O_3[M+H]^+$: υπολογίστηκε 424.1, βρέθηκε 424.1.

Σύνθεση του 6-βρωμο-Ν-(1,4-διοξο-2,3-διυδροφθαλαζιν-5-υλο)εξαναμιδίου **14** (απομόνωση ως μίγμα με 6-βρωμοεξανοϊκό οξύ).



Σε προξηραμένη υπό ροή αργού σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 100 mL προστέθηκε το 6-βρωμοεξακανοϊκό οξύ (100 mg, 0.51 mmol) και θειονυλοχλωρίδιο (12.13 g, 102 mmol, 7.4 mL). Το μίγμα αφέθηκε να βράσει υπό επαναρροή (reflux) για 3 ώρες υπό ατμόσφαιρα αργού και στη συνέχεια αποστάχθηκε υπό κενό σε θερμοκρασία δωματίου. Στο υπόλειμμα προστέθηκε στάγδην στους 0 °C αιώρημα λουμινόλης (85.8 mg, 0.48 mmol) και τριαιθυλαμίνης (103 mg, 1.02 mmol, 0.14 mL) σε διχλωρομεθάνιο (7 mL) και το μίγμα αφέθηκε να αναδεύεται για 24h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκπλυση του μίγματος της αντίδρασης με νερό, ξήρανση της οργανικής στιβάδας με θειικό μαγνήσιοκαι συμπύκνωση μέχρι ξηρού. Το προϊόν που παραλήφθηκε ύστερα από χρωματογραφία στήλης (x3) ταυτοποιήθηκε ως μίγμα των **5** και 6-βρωμοεξανοϊκού οξέος σε αναλογία 1/1 .Το προϊόν παραλήφθηκε ύστερα από χρωματογραφία στήλης (x3), (Μεθανόλη / διχλωρομεθάνιο: 2/98, 4/96, 8/92, 10/90).

Καφέ κολλώδες στερεό: 17 mg, απόδοση: 10%

 $R_{f}(MeOH/DCM: 2/98) = 0.65$

¹HNMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 11.61 (bs, 2H, NH), 8.91 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-6), 7.67 (t, J = 8 Hz, 1H, H-7), 7.54 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H-8), 3.44 (t, J = 7 Hz, 2H+2H*, CH₂Br), 2.40– 2.26 (m, 2H+2H*, CH₂CO), 2.01 - 1.80 (m, 2H+2H*, CH₂CH₂Br), 1.76 – 1.42 (m, 4H+4H*, CH₂).

ES-MSm/z για $C_{14}H_{17}BrN_3O_3[M+H]^+$: υπολογίστηκε 354.1, βρέθηκε 354.1.

*Κορυφές που αποδίδονται στο 6-βρωμοεξανοϊκό οξύ

Σύνθεση της 4-νιτροϊσοβενζοφουραν-1,3-διόνης 21.

$$NO_2 O$$

$$4$$

$$3a$$

$$3$$

$$6$$

$$7$$

$$7a$$

$$0$$

$$1$$

$$0$$

Σε προξηραμένη υπό ροή αργού σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 250mL προστέθηκε το 3-νιτροφθαλικό οξύ (5.73g, 27.14 mmol) και οξικός ανυδρίτης (9 mL) και το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε σε επαναρροή (reflux) στους 100 °C για μια ώρα. Έπειτα, το μίγμα αποστάχθηκε υπό κενό για να απομακρυνθεί το παραγόμενο οξικό οξύ και τελικά το προϊόν παραλήφθηκε ύστερα από καταβύθιση από διαιθυλαιθέρα. Υποκίτρινο στερεό: 4.46 g, απόδοση: 90% Rf (MeOH/DCM: 40/60) = 0.12 ¹HNMR (200 MHz, CDCl₃) δ: 8.41 (dd, J = 8.0, 1.0 Hz, 1H, H-5), 8.32 (dd, J = 7.7, 1.0 Hz, 1H, H-7), 8.14 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H-6). ¹³C HMR (50 MHz, CD₃OD) δ: 169.14 (C₁=O), 166.97 (C₃=O), 147.91 (C-4), 136.51 (C-6), 132.23 (C-7a), 131.83 (C-3a), 131.33 (C-7), 128.86 (C-5).

Σύνθεση της 2-(sec-βουτυλο)-4-νιτροϊσοϊνδολιν-1,3-διόνης 22.



Σε προξηραμένη υπό ροή αργού σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 250mL προστέθηκε η διόνη **21** (1g, 5.16 mol), sec-βουτυλαμίνη (0.565g, 7.74 mol) και οξικό οξύ (10 mL) ως διαλύτης. Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε σε επαναρροή (reflux) στους 110 °C για 3.5 ώρες. Έπειτα, ακολούθησε συμπύκνωση του μίγματος της αντίδρασης, διάλυση του υπολείμματος σε διχλωρομεθάνιο (50 mL) και εκπλύσεις της οργανικής φάσης με νερό (3 x 20 mL). Το προϊόν παραλήφθηκε έπειτα από ξήρανση της οργανικής φάσης με

Καφέ στερεό : 953 mg, απόδοση 75%.

 $R_f(DCM) = 0.73$

¹HNMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 8.07 (m, 2H, H-5, H-7), 7.90 (t, J = 7.0 Hz, 1H, H-6), 4.60 – 3.94 (m, 1H, H.2), 2.30 – 1.62 (m, 2H, H-3), 1.45 (d, J = 6.9 Hz, 3H, H-1), 0.86 (t, J = 7.4 Hz, 3H, H-4).

¹³C HMR (50 MHz, CDCl₃) δ : 165.98 (*C*₁=O), 163.08 (*C*₃=O), 144.91 (C-4), 135.34 (C-6), 133.85 (C-7a), 128.86 (C-7), 126.82 (C-5), 123.33 (C-3a), 49.91 (C-2), 26.58 (C-3), 18.10 (C-1), 11.20 (C-4).

ES-MS m/z για $C_{12}H_{12}N_2O_4[M+MeOH+NH_4]^+$:υπολογίστηκε 298.0, βρέθηκε 298.1.

Σύνθεση της 4-αμινο-2-(sec-βουτυλο)ισοϊνδολιν-1,3-διόνης 18.



Σε προξηραμένη υπό ροή αργού σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 250mL προστέθηκε η διόνη **22** (3.24g,13 mmol) σε μεθανόλη (120 mL,όχι ξηρή) και αφού το μίγμα της αντίδρασης απαερώθηκε για μια ώρα υπό ατμόσφαιρα αργού, προστέθηκε παλλάδιο 5% σε ενεργό άνθρακα ως καταλύτης (0.60g, 13mmol) και το μίγμα αφέθηκε να αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Το μίγμα της αντίδρασης διηθήθηκε από celite, εκπλύθηκε με μεθανόλη και το προϊόν παραλήφθηκε από χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο). Κίτρινο στερεό : 2.5 g, απόδοση 88%.

 $R_{f}(DCM) = 0.75$

¹HNMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 7.26 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H-6), 6.98 (d, J = 7.1 Hz, 1H, H-5), 6.77 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-7), 5.31 (bs, 2H, NH₂), 4.22 – 3.98 (m, 1H, H-2), 2.04 – 1.52 (m, 2H, H-3), 1.35 (d, J = 6.9 Hz, 3H,H-1), 0.77 (t, J = 7.4 Hz, 3H, H-4).

¹³C HMR (50 MHz, CDCl₃) δ : 170.51 (*C*₃=O), 168.84 (*C*₁=O), 145.27 (C-4), 134.82 (C-6), 132.52 (C-7a), 120.88 (C-7), 112.10 (C-5), 110.92 (C-3a), 48.48 (C-2), 26.81 (C-3), 18.40 (C-1), 11.23 (C-4).

ES-MSm/z για $C_{12}H_{13}N_2O_2[M-H]^-$:υπολογίστηκε 217.1, βρέθηκε 217.2.



Σε διάλυμα της αμίνης **18** (50 mg, 0.23 mmol) σε διχλωρομεθάνιο (6 mL) προστέθηκαν οξικός ανυδρίτης (129 mg, 1.26 mmol) και ξηρή πυριδίνη (90.9 mg, 1.15 mmol, 92.7 μL) και το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να αναδευτεί για 5 ώρες στους 35 °C υπό ατμόσφαιρα αργού. Στη συνέχεια, ακολούθησε διάλυση του υπολείμματος σε διχλωρομεθάνιο (40 mL), εκπλύσεις με νερό (3x 15 mL), ξήρανση της οργανικής φάσης με θειικό μαγνήσιοκαι συμπύκνωση. Το προϊόν παραλήφθηκε από χρωματογραφία στήλης (Μεθανόλη / διχλωρομεθάνιο: 0/100, 1/99).

Καφέ στερεό : 42.5 mg, απόδοση 72%.

R_f(MeOH/DCM: 1/99) = 0.40

¹HNMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 9.59 (s, 1H,NH), 8.74 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-5), 7.64 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H-6), 7.47 (d, J = 7.2 Hz, 1H, H-7), 4.46 – 3.99 (m, 1H, H.2), 2.26 (s, 3H, COCH₃), 2.10 – 1.62 (m, 2H, H-3), 1.45 (d, J = 6.9 Hz, 3H, H-1), 0.87 (t, J = 7.3 Hz, 3H, H-4).

¹³C HMR (50 MHz, CDCl₃) δ: 170.75 (C₃=O), 169.38 (COCH₃) ,168.09 (C₁=O),
137.36 (C-4), 135.79 (C-6), 131.47 (C-7a), 124.67 (C-7), 117.89 (C-5), 115.59 (C-3a), 49.28 (C-2), 26.99 (C-3), 25.08 (COCH₃), 18.56 (C-1), 11.40 (C-4).
ES-MSm/z για C₁₄H₁₅N₂O₃[M-H]⁻: υπολογίστηκε 259.1, βρέθηκε 259.1.

Σύνθεση του 11-βρωμο-Ν-(2-(sec-βουτυλο)-1,3-διοξοϊσοϊνδολιν-4υλο)εντεκαναμιδίου **25.**



Σε προξηραμένη υπό ροή αργού σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 25mL προστέθηκε το οξύ **7** (0.225 g, 0.84 mmol) και θειονυλοχλωρίδιο (11.10 g, 93 mmol, 6.7 mL). Το μίγμα έβρασε υπό επαναρροή (reflux) για 3 ώρες υπό ατμόσφαιρα αργού και στη συνέχεια αποστάχθηκε υπό κενό σε θερμοκρασία δωματίου. Στο υπόλειμμα προστέθηκε στάγδην στους 0 °C, διάλυμα του παραγώγου **18** (0.180 g, 0.84 mmol), τριαιθυλαμίνη (0.169 g, 1.68 mmol) και ξηρή πυριδίνη (0.33 g, 4.2 mmol) σε διχλωρομεθάνιο (12 mL) και το μίγμα αφέθηκε να αναδεύεται για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκπλυση του μίγματος της αντίδρασης με νερό (3x 15 mL), ξήρανση της οργανικής στιβάδας με θειικό μαγνήσιο και συμπύκνωση μέχρι ξηρού. Το προϊόν παραλήφθηκε ύστερα από χρωματογραφία στήλης (Πετρελαϊκός αιθέρας / οξικός αιθυλεστέρας: 100/0, 90/10, 80/20, 0/100).

Καφέ ελαιώδες στερεό : 36 mg, απόδοση 9%.

Rf (PE/EtOAc: 90/10) = 0.23

1H NMR (200 MHz, CDCl3) δ : 9.57 (s, 1H, NH), 8.73 (d, J = 9.1 Hz, 1H, H-5), 7.60 (t, J = 7.7 Hz, 1H, H-6), 7.42 (d, J = 7.3 Hz, 1H, H-7), 4.23 – 4.03 (m, 1H, H-2), 3.35 (t, J = 6.3 Hz, 2H, BrCH2), 2.43 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH2CONH), 1.97 – 1.55 (m, 8H, H-3, CH2), 1.42 (d, J = 6.9 Hz, 3H, H-1), 1.34 – 1.18 (m, 10H, CH₂), 0.84 (t, J = 6.8 Hz, 3H, H-4).

13C NMR (50 MHz, CDCl3) δ: 172.59 (C=O), 170.80 (C3=O) ,168.15 (C1=O), 137.47 (C-4), 135.80 (C-6), 131.50 (C-7a), 124.74 (C-7), 117.80 (C-5), 115.63 (C-3a), 49.29 (C-2), 38.15 (CH₂CONH), 34.18 (CH₂Br), 32.95 (CH₂CH₂Br), 27.01 (C-3'), 25.41 (CH₂CH₂CO), 22.48 (CH₂CH₂CH₂CO),18.58 (C-1'), 11.43(C-4'). ES-MSm/z για C₂₃H₃₄BrN₂O₃ [M+H]⁺:υπολογίστηκε 465.2, βρέθηκε 465.2 Σύνθεση του (11-((2-(sec-βουτυλο)-1,3-διοξοϊσοϊνδολιν-4-υλο)αμινο)-11οξοεντεκυλο)τριφαινυλοφώσφινο βρωμιδίου **16**.



Σε διάλυμα του βρωμιδίου 25 (170 mg, 0.36 mmol) σε ξηρό ακετρονιτρίλιο (15 mL), προστέθηκε τριφαινυλοφωσφίνη (287 mg, 1.09 mmol) σε προξηραμένη δίλαιμη σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 50 mL και το μίγμα αφέθηκε να βράσει υπό επαναρροή (reflux) για 3 ημέρες υπό ροή αργού. Έπειτα, το μίγμα της αντίδρασης ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, συμπυκνώθηκε υπό ελαττωμένη πίεση και το προϊόν παραλήφθηκε από χρωματογραφία στήλης οξικός αιθυλεστέρας: (Πετρελαϊκός αιθέρας 1 90/10,70/30, 0/100, διχλωρομεθάνιο/ οξικός αιθυλεστέρας:50/50, διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη: 98/2, 95/5, 90/10, 88/12).

Καφέ στερεό : 207 mg, απόδοση 80%.

R_f(MeOH/DCM: 5/95) = 0.23

¹HNMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 9.52 (s, 1H, N*H*), 8.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 7.95 – 7.48 (m, 16H,Ar-H , H-6),7.38 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-7), 4.27 – 4.00 (m, 1H, H.2'), 3.79 – 3.42 (m, 2H, CH₂P⁺Ph₃), 2.35 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂CO), 1.92 – 1.54 (m, 8H, H.3',CH₂), 1.38 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-1'), 1.29 – 1.04 (m, 10H, CH₂), 0.80 (t, *J* = 7.3 Hz,H-4').

¹³CHMR (50 MHz, CDCl₃) δ : 172.33 (C=O), 170.45 (C₃=O) ,167.89 (C₁=O), 137.18 (C- 4), 135.53 (C- 6), 134.99 (d, *J* = 3.0 Hz, P⁺Ph₃para), 133.50 (d, *J* = 9.9 Hz, P⁺Ph₃ortho), 131.24 (C- 7a), 130.44 (d, *J* = 12.6 Hz, P⁺Ph₃meta), 124.45 (C- 7), 118.14 (d, J = 85.9 Hz, P⁺Ph₃ipso), 117.51 (C- 5), 115.40 (C- 3a), 49.29 (C- 2), 38.12 (CH₂CONH), 30.32 (d, J = 15.6 Hz, CH₂CH₂CH₂P⁺Ph₃), 26.73 (C- 3'), 25.11 (CH₂CH₂CO), 22.61 (d, J = 49.5 Hz, CH₂P⁺Ph₃), 22.50 (d, J = 3.4 Hz, CH₂CH₂P⁺Ph₃), 18.34 (C- 1'), 11.19(C- 4').

³¹PNMR (81 MHz, CDCl₃) δ: 25.49.

ES-MSm/z για $C_{41}H_{48}N_2O_3P[M]^+$: υπολογίστηκε 647.3, βρέθηκε 647.3.

Σύνθεση του (11-((1,4-διοξο-1,2,3,4-τετραυδροφθαλαζιν-5-υλο)αμινο)-11οξοεντεκυλο)τριφαινυλοφώσφινο βρωμιδίου **3**.



Σε διάλυμα του ιμιδίου **16**(100 mg, 0.13 mmol) σε αιθανόλη (15 mL), προστέθηκε 35% υδατικό διάλυμα υδραζίνης (27.5 mg, 10.81 mmol) σε προξηραμένη δίλαιμη σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 25 mL και το μίγμα έβρασε με επαναρροή (reflux) για 3 ώρες υπό ροή αργού. Ακολούθησε συμπύκνωση του μίγματος της αντίδρασης, διάλυση του υπολλείμματος σε διχλωρομεθάνιο (50 mL) και εκπλύσεις της οργανικής στιβάδας με νερό (3 x 20 mL). Η οργανική στιβάδα ξηράνθηκε με θειικό μαγνήσιο, συμπυκνώθηκε και καθαρίστηκε από χρωματογραφία στήλης (Μεθανόλη / διχλωρομεθάνιο: 10/90, 12/88, 16/84, 20/80, Μεθανόλη / διχλωρομεθάνιο / τριαιθυλαμίνη: 20/78/2, 40/58/2).

Καφέ κολλώδες στερεό : 34 mg, απόδοση 38%.

R_f(MeOH/DCM: 13/87) = 0.50

¹HNMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 12.68 (s, 1H, NH), 11.47 (bs, 2H, NH), 8.99 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-6), 8.09 – 7.41 (m, 17H, Ar-H, H-7, H-8), 3.71 – 3.39 (m, 2H, $CH_2P^+Ph_3$), 2.39 (t, J = 6.5 Hz, 2H, CH_2CO), 1.76 – 1.48 (m, 6H, CH_2), 1.37 – 1.05 (m, 10H, CH_2).

¹³CHMR (50 MHz, CDCl₃) δ: 175.67 (C=O), 159.74 (C₄=O) ,154.90 (C₁=O), 141.40 (C-5), 135.19(d, J = 3.0 Hz, P⁺Ph₃para), 134.42 (C-7) ,133.61 (d, J = 9.8 Hz, P⁺Ph₃ortho), 130.61 (d, J = 12.5 Hz, P⁺Ph₃meta), 128.24 (C-8a), 122.73 (C-8), 119.82 (C-6), 118.31 (d, J = 86.0 Hz, P⁺Ph₃ipso), 115.14 (C-4a), 38.79 (CH₂CONH), 30.43 (d, J = 16.1 Hz, CH₂CH₂CH₂P⁺Ph₃), 27.19 (CH₂CH₂CH₂CO), 25.40 (CH₂CH₂CO), 22.70 (d, J = 4.2 Hz, CH₂CH₂P⁺Ph₃), 22.54 (d, J = 51.3 Hz, CH₂P⁺Ph₃).

³¹PNMR (81 MHz, CDCl₃) δ: 25.49.

ERMSm/z για $C_{37}H_{41}N_3O_3P[M]^+$: υπολογίστηκε 606.2880, βρέθηκε 606.2928.

Σύνθεση του 6-βρωμο-Ν-(2-(sec-βουτυλο)-1,3-διοξοϊσοϊνδολιν-4υλο)εξαναμιδίου **26**.



Σε προξηραμένη υπό ροή αργού σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 25mL προστέθηκε το οξύ **8** (0.607 g, 3.1 mmol) και θειονυλοχλωρίδιο (36 g, 31 mmol, 22 mL) και το μίγμα αφέθηκε να βράσει υπό επαναρροή (reflux) για 3 ώρες υπό ατμόσφαιρα αργού. Ακολούθησε απόσταξη του μίγματος της αντίδρασης υπό κενό σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα στο υπόλειμμα προστέθηκε στάγδην στους 0 °C διάλυμα του παραγώγου **18** (0.680 g, 3.1 mmol), τριαιθυλαμίνη (0.31 g, 3.1 mmol) και ξηρή πυριδίνη (1.22 g, 15.5 mmol) σε διχλωρομεθάνιο (18 mL) και το μίγμα αφέθηκε να αναδεύεται για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκπλυση του μίγματος της αντίδρασης με νερό (3x 15 mL), ξήρανση της οργανικής στιβάδας με θειικό μαγνήσιοκαι συμπύκνωση μέχρι ξηρού. Το προϊόν παραλήφθηκε ύστερα από χρωματογραφία στήλης (Πετρελαϊκός αιθέρας / οξικός αιθυλεστέρας: 90/10, 80/20, 50/50, 0/100). Καφέ ελαιώδες στερεό : 283 mg, απόδοση 23%.

R_f(PE/EtOAc: 80/20) = 0.63

¹HNMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 9.48 (s, 1H, N*H*), 8.61 (d, *J* = 8.4 Hz, H-5), 7.51 (dd, *J* = 8.1, 7.6 Hz, 1H, H-6), 7.32 (d, *J* = 7.3 H, H-7), 4.16 – 4.01 (m, 1H, H.2'), 3.29 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, BrC*H*₂), 2.37 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, C*H*₂CONH), 1.87 – 1.53 (m, 6H, H.3', C*H*₂), 1.33 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-1'), 1.11 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, C*H*₂(CH₂)₂CONH), 0.74 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, H-4').

¹³C HMR (50 MHz, CDCl₃) δ: 171.63(C=O), 170.34 (C_3 =O) ,167.64 (C_1 =O), 137.04 (C-4), 135.42 (C-6), 131.19 (C-7a), 124.29 (C-7), 117.44 (C-5), 115.35 (C-3a), 48.91(C-2'), 37.37 (CH₂CONH), 33.22 (CH₂Br), 32.24 (CH₂CH₂Br), 27.48 (CH₂(CH₂)₂Br), 26.67 (C-3'), 18.20 (C-1'), 11.10(C-4').

ES-MSm/z για $C_{18}H_{24}BrN_2O_3[M+H]^+$: υπολογίστηκε 394.1, βρέθηκε 395.1.

Σύνθεση του (6-((2-(sec-βουτυλο)-1,3-διοξοϊσοϊνδολιν-4-υλο)αμινο)-6οξοεξυλο)τριφαινυλοφώσφινο βρωμιδίου **17**.



Σε διάλυμα της ένωσης **26** (250 mg, 0.63 mmol) σε ξηρό ακετρονιτρίλιο (20 mL), προστέθηκε τριφαινυλοφωσφίνη (490 mg, 1.8 mmol) σε προξηραμένη δίλαιμη σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 50 mL και το μίγμα αφέθηκε να βράσει υπό επαναρροή (reflux) για 2 ημέρες υπό ροή αργού. Έπειτα, το μίγμα της αντίδρασης ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, συμπυκνώθηκε υπό ελαττωμένη πίεση και το προϊόν παραλήφθηκε από χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη: 98/2, 95/5, 90/10). Καφέ στερεό : 223 mg, απόδοση 53%.

R_f(MeOH/DCM: 10/90) = 0.4

¹HNMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 9.37 (s, 1H, N*H*), 8.45 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-5), 7.77 – 7.34 (m, 16H, Ar-H, H-6), 7.25 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-7), 4.10 – 3.85 (m, 1H, H.2'), 3.60 – 3.33 (m, 2H, CH₂P⁺Ph₃), 2.26 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂CO), 1.91 – 1.41 (m, 8H, H.3', CH₂), 1.23 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-1'), 0.65 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, H-4').

¹³CHMR (50 MHz, CDCl₃) δ : : 171.64 (C=O), 169.92 (C₃=O) ,167.62 (C₁=O), 136.63 (C-4), 135.23 (C-6), 134.82 (d, *J* = 3.0 Hz, P⁺Ph₃para), 133.20 (d, *J* = 9.9 Hz, P⁺Ph₃ortho), 130.98 (C-7a), 130.23 (d, *J* = 12.5 Hz, P⁺Ph₃meta), 124.36 (C-7), 117.68 (d, *J* = 86.1 Hz, P⁺Ph₃ipso), 117.39 (C-5), 115.37 (C-3a), 49.62 (C-2), 36.74 (CH₂CONH), 29.32 (d, *J* = 16.3 Hz, CH₂CH₂CH₂P⁺Ph₃), 26.44 (C- 3'), 24.00 (CH₂CH₂CO), 22.04 (d, *J* = 50.7 Hz, CH₂P⁺Ph₃), 21.93 (d, *J* = 3.4 Hz, CH₂CH₂P⁺Ph₃), 18.06 (C- 1'), 10.93 (C- 4').

³¹PNMR (81 MHz, CDCl₃) δ: 24.89.

ES-MSm/z για $C_{36}H_{38}N_2O_3P[M]^+$: υπολογίστηκε 577.3, βρέθηκε 577.3.

Σύνθεση του (6-((1,4-διοξο-1,2,3,4-τετραυδροφθαλαζιν-5-υλο)αμινο)-6οξοεξυλο)τριφαινυλοφώσφινο βρωμιδίου **4**.



Σε διάλυμα του παραγώγου **17**(200 mg, 0.30 mmol) σε αιθανόλη (25 mL), προστέθηκε στάγδην 35% υδατικό διάλυμα υδραζίνης(27.5 mg, 6 mmol) σε προξηραμένη δίλαιμη σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 50 mL και το μίγμα έβρασε υπό επαναρροή (reflux) για 4 ώρες υπό ροή αργού. Ακολούθησε συμπύκνωση του μίγματος της αντίδρασης, διάλυση του υπολλείμματος σε διχλωρομεθάνιο (50 mL) και εκπλύσεις της οργανικής στιβάδας με νερό (3 x 20 mL). Η οργανική στιβάδα ξηράνθηκε με θειικό μαγνήσιο, συμπυκνώθηκε και καθαρίστηκε από χρωματογραφία στήλης (Μεθανόλη / διχλωρομεθάνιο: 10/90, 12/88, 16/84, 20/80, 25/85).

Καφέ στερεό : 98 mg, απόδοση 53%.

R_f(MeOH/DCM: 13/87) = 0.67

¹HNMR (200 MHz, CDCl₃) δ: 12.53 (s, 1H, NH), 12.06 (bs, 2H, NH),8.79 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-6), 8.13 – 7.31 (m, 17H, Ar-H, H-7, H-8), 3.76 – 3.45 (m, 2H, CH₂P⁺Ph₃), 2.35 – 2.25 (m, 2H, CH₂CO), 1.84 – 1.46 (m, 6H, CH₂).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ : 172.22 (C=O), 160.09 (C₄=O), 154.65 (C₁=O), 141.08 (C-5), 135.32 (d, *J* = 3.0 Hz, P⁺Ph₃para), 134.42 (C-7), 133.70 (d, *J* = 9.9 Hz, P⁺Ph₃ortho),130.73 (d, *J* = 12.5 Hz, P⁺Ph₃meta), 128.09 (C-8a), 122.40 (C-8), 119.81 (C-6), 118.22 (d, *J* = 86.0 Hz, P⁺Ph₃ipso), 114.98 (C-4a), 38.12 (CH₂CONH), 29.90 (d, *J* = 15.8 Hz, CH₂CH₂CH₂P⁺Ph₃), 24.57 (CH₂CH₂CO), 22.43 (d, *J* = 3.9 Hz, CH₂CH₂P⁺Ph₃), 22.43 (d, *J* = 49.6 Hz, CH₂P⁺Ph₃).

³¹PNMR (81 MHz, CDCl₃) δ: 25.12

HRMSm/z για $C_{32}H_{31}N_3O_3P[M]^+$: υπολογίστηκε 536.2098, βρέθηκε 536.2167.

Σύνθεση της 2,7-διυδρο-[1,3]θειαζινο[6,5,4-de]φθαλαζινο-3,8-διόνης **32** ως μίγμα με τη 2,7-διυδρο-[1,3]οξαζινο[6,5,4-de]φθαλαζινο-3,8-διόνη **33**.



Σε διάλυμα λουμινόλης (1g, 5.6 mmol) σε ξηρό τετραϋδροφουράνιο (20 mL) προστέθηκε στάγδην στους 0 °C θειοφωσγένιο (0.64 g, 5.6 mmol) και τριαιθυλαμίνη (0.56 g, 5.6 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να αναδεύεται για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αργού. Στη συνέχεια, το μίγμα συμπυκνώθηκε υπό κενό και ακολούθησε αιώρηση του υπολείμματος σε νερό, διήθηση και εκπλύσεις με ακετόνη και μεθανόλη. Τελικά, παραλήφθηκε μίγμα της θειοκαρβονυλιωμένης ένωσης **32** και της καρβονυλιωμένης ένωσης **33** σε αναλογία 2/1, το οποίο δεν ήταν δυνατόν να διαχωριστεί.

Υποκίτρινο στερεό: 600 mg, απόδοση της ένωσης 32: 56%

¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ: 13.24 (s, 1H, NH), 12.15 (s, 1H, NH),12.06 (s, 1H*, NH*), 11.06 (s, 1H, NH*), 7.95 – 7.61 (m, 4H, Ar-H, Ar-H*), 7.34 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-7), 7.25 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-7*).

¹³C HMR (50 MHz, DMSO-d₆) δ: 179.47, 159.05*, 158.94, 148.45*, 147.57, 146.71*, 136.29*, 135.53, 135.35*, 133.81, 128.10*, 127.88, 120.81, 119.16*, 116.67, 116.47*, 111.24, 109.74*.

IR (KBr) *v*: 3191-2962 (N-H), 1747 (N(C=O)O)*, 1662, 1637, 1614 (υδραζιδικάNC=O, C=N), 1145 (C=S) cm⁻¹.

ES-MSm/z για C₉H₄N₃O₂S[M-H]⁻ και C₉H₄N₃O₃[M-H]^{-*}: υπολογίστηκαν 218.0 και 202.0*, βρέθηκαν 218.1 και 202.1*.

*Κορυφές που αποδίδονται στην καρβονυλιωμένη ένωση 33.

Σύνθεση της 6-ισοθειοκυανατο-2,3-διυδροφθαλαζιν-1,4-διόνης 35.



Σε διάλυμα της ισολουμινόλης (1g, 5.6 mmol) σε ξηρό τετραϋδροφουράνιο(55 mL) προστέθηκε στάγδην στους 0 °C θειοφωσγένιο (0.77 g, 6.7 mmol) και ακολούθησε η προσθήκη τριαιθυλαμίνης (0.67 g, 6.7 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να αναδεύεται για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αργού. Στη συνέχεια, το μίγμα συμπυκνώθηκε υπό κενό και

ακολούθησε αιώρηση του υπολείμματος σε νερό, διήθηση και εκπλύσεις με ακετόνη και μεθανόλη, δίνοντας την ισοθειοκυανική ένωση **35**.

Πορτοκαλί στερεό: 1.07 g, απόδοση της ένωσης **35**: 86% ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ: 11.64 (bs, 1H, NH), 10.72 (bs, 1H, NH), 8.37 – 7.95 (m, 3H, ArH) IR (KBr) ν̃: 3150-2912 (N-H), 2069 (N=C=S), 1602, 1659, (NC=O) cm⁻¹. ES-MSm/z για C₁₀H₈N₃O₃S[M+MeO]⁻: υπολογίστηκε 250.0, βρέθηκε 250.1.

Αντίδρασητου 1,10-διβρωμοδεκανίου με τριφαινυλοφωσφίνη

Σε προξηραμένη υπό ροή αργού σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 50 mL προστέθηκαν διαδοχικά 1,10-διβρωμοδεκάνιο (1.71 5.7 mmol). g, τριφαινυλοφωσφίνη (1g, 3.8 mmol) και τολουόλιο (15 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να αναδεύεται υπό βρασμό με επαναρροή (reflux) υπό ατμόσφαιρα αργού για 48 ώρες. Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης συμπυκνώθηκε υπό κενό και υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (Μεθανόλη / διχλωρομεθάνιο: 5/95, 10/90), απ' όπου απομονώθηκαν 2 κλάσματα. Το πρώτο (R_f = 0.46 σε μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο: 10/90, 362 mg, καφέ κολλώδες στερεό) ήταν μίγμα, το οποίο περιείχε την ένωση 39 σύμφωνα με τα φασματοσκοπικά δεδομένα. Το δεύτερο ταυτοποιήθηκε ως η ένωση 40.

Δεκανο-1,10-διυλοδις(τριφαινυλοφωσφινο) βρωμίδιο 40



Καφέ κολλώδες στερεό: 362 mg, απόδοση: 35%

R_f(Μεθανόλη / διχλωρομεθάνιο: 10/90) = 0.46

¹HNMR (200 MHz, CD₃OD) δ: 7.99,– 7.62 (m, 30H, Ar-H), 3.70 – 3.40 (m, 4H, $CH_2P^+Ph_3$), 1.87 – 1.43 (m, 8H, CH_2), 1.43 – 1.08 (m, 8H, CH_2).

¹³CHMR (50 MHz, CD₃OD) δ : 136.11 (d, J = 2.9 Hz, P⁺Ph₃para), 134.76 (d, J = 10.0 Hz, P⁺Ph₃ortho), 131.47 (d, J = 12.5 Hz, P⁺Ph₃meta), 119.88 (d, J = 86.2 Hz, P⁺Ph₃ipso), 31.57 (CH₂), 31.24 (CH₂), 29.90 (d, J = 16.5 Hz, CH₂CH₂CH₂P⁺Ph₃), 23.46 (d, J = 4.4 Hz, CH₂CH₂P⁺Ph₃), 22.53 (d, J = 50.4 Hz, CH₂P⁺Ph₃).

³¹P NMR (81 MHz, CD₃OD) δ: 24.94.

ES-MSm/z για $C_{46}H_{50}P^{2+}$ [M]⁺ :υπολογίστηκε 332.2, βρέθηκε 332.2

Αντίδραση της ένωσης **5** με πιπεραζίνη.

Σε διάλυμα υδροχλωρικού 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)καρβοδιιμιδίου (364 mg, 1.9 mmol) και 1-υδροξυβενζοτριαζολίου (192 mg, 1.42 mmol) σε διχλωρομεθάνιο (12 mL) προστέθηκε η ένωση **5**(500 mg, 0.96 mmol). Κατόπιν, στο διάλυμα αυτό προστέθηκε στάγδην διάλυμα πιπεραζίνης (198 mg, 3.7 mmol) στον ίδιο διαλύτη (12 mL) στους 0 °C. Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να αναδεύεται για 5 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αργού. Ακολούθησε διήθηση από υάλινο πορώδη ηθμό (G₃), εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (x3), έκπλυση της οργανικής στιβάδας με υδατικό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου συγκέντρωσης 5M (pH~ 12) και ξήρανση με θειικό μαγνήσιο.Στη συνέχεια, η οργανική στιβάδα συμπυκνώθηκε υπό κενό και υποβλήθηκε σε χρωματογραφία στήλης (Μεθανόλη / διχλωρομεθάνιο: 0/100, 5/95, 10/90, 20/80, Μεθανόλη / διχλωρομεθάνιο / τριαιθυλαμίνη: 30/69/1, 59/40/1), απ' όπου απομονώθηκαν 2 κλάσματα. Το πρώτο ταυτοποιήθηκε ως η ένωση**42**και το δεύτερο ως η ένωση **43**.



Καφέ στερεό: 70 mg, απόδοση: 13%

R_f(MeOH / DCM: 10/90) = 0.40

¹HNMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 7.89 (bs, 1H, NH), 7.88 – 7.44 (m, 15H, Ar-H), 3.96 – 3.69 (m, 4H), 3.59 – 3.30 (m, 2H, $CH_2P^+Ph_3$), 3.03 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 2.19 (t, J = 8 Hz, 2H, CH_2CO), 1.70 – 1.37 (m, 6H, CH_2), 1.35 - 0.98 (m, 10H, CH_2).

¹³CHMR (50 MHz, CDCl₃) δ : 171.53 (C=O), 135.23 (d, *J* = 2.9 Hz, P⁺Ph₃para), 133.42 (d, *J* = 9.9 Hz, P⁺Ph₃ortho), 130.57 (d, *J* = 12.5 Hz, P⁺Ph₃meta), 117.96 (d, *J* = 86.0 Hz, P⁺Ph₃ipso), 38.08 (CH₂CO), 32.85 (CH₂CH₂CO), 30.41 (d, *J* = 15.9 Hz, CH₂CH₂CH₂P⁺Ph₃), 22.62 (d, *J* = 50.6 Hz, CH₂P⁺Ph₃), 22.51 (d, *J* = 3.9 Hz, CH₂CH₂P⁺Ph₃).

³¹PNMR (81 MHz, CDCl₃) δ: 24.35

ES-MSm/z για $C_{33}H_{44}N_2OP^+$ [M] ⁺: υπολογίστηκε 515.3, βρέθηκε 515.3

(πιπεραζιν-1,4- διϋλοδις(11-οξοεντεκαν-11,1- διϋλο))-δις(τριφαινυλοφωσφινο) βρωμιδίο **43.**



Καφέ στερεό: 80 g, απόδοση: 18%

R_f(MeOH / DCM: 10/90) = 0.60

¹HNMR (200 MHz, CDCl₃) δ : 7.88 – 7.57 (m, 30H, Ar-H), 3.74 – 3.23 (m, 4H, $CH_2P^+Ph_3$, 8H, NC H_2CH_2NH), 2.24 (t, J = 7.0 Hz, 4H, CH_2CO), 1.69 – 1.42 (m, 12H, CH_2), 1.27 – 1.05 (m, 20H, CH_2).

¹³CHMR (50 MHz, CDCl₃) δ : 171.98 (C=O), 135.06 (d, J = 2.7 Hz, P⁺Ph₃para), 133.51 (d, J = 9.9 Hz, P⁺Ph₃ortho), 130.50 (d, J = 12.5 Hz, P⁺Ph₃meta), 118.20 (d, J = 85.8 Hz, , P⁺Ph₃ipso), 33.28 (*CH*₂CO), 30.38 (d, J = 15.7 Hz, *CH*₂CH₂CH₂P⁺Ph₃), 25.14 (*CH*₂CH₂CO), 22.46 (d, J = 49.3 Hz, *CH*₂P⁺Ph₃), 22.55 (d, J = 3.8 Hz, *CH*₂CH₂P⁺Ph₃).

³¹P NMR (81 MHz, CDCl₃) δ: 24.35

ES-MSm/z για $C_{62}H_{78}N_2O_2P_2^{2+}$ [M] ⁺: υπολογίστηκε 472.3, βρέθηκε 472.4.
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ- ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ- ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

ALA	Αμινολεβουλινικό οξύ
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
DCC	Ν,Ν'-δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο
DCM	Διχλωρομεθάνιο
DHE	Διαιματοπορφυρίνη
DMAP	4-διμεθυλοαμινοπυριδίνη
DMF	Ν,Ν'-διμεθυλοφορμαμίδιο
EDC	Υδροχλωρικό 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)-καρβοδιμίδιο
FADH2	Φλάβινο αδένινο δινουκλεοτίδιο
FECH	Φεροχηλατάση
FIA	Ανάλυση έγχυσης ροής
FMN	Φλάβινομονονουκλεοτίδιο
FTMT	Φεριτίνη
HpD	Αιματοπορφυρίνη
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης
NADH	Νικοτινάμιδο αδένινο δινουκλεοτίδιο
NHS	Ν-υδροξυσουκινιμίδιο
NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
PDT	Φωτοδυναμική θεραπεία

PE	Πετρελαϊκός αιθέρας
PPIX	Πρωτοπορφυρίνη ΙΧ
ROS	Ενεργές μορφές οξυγόνου
SOCI ₂	θειονυλοχλωρίδιο
TEA	Τριαιθυλαμίνη
THF	Τετραϋδροφουράνιο
TPP	Τριφαινυλοφωσφίνη
WHO	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Hajdu, S. I., A note from history: landmarks in history of cancer, part 1., *Cancer*, **2011**,*117*, 1097-1102.

2. Merlo, L. M.; Pepper, J. W.; Reid, B. J.; Maley, C. C., Cancer as an evolutionary and ecological process., *Nat. Rev. Cancer*,**2006**,*6*, 924-935.

 Τσουκαλάς, Ν. Διδακτορική διατριβή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Αθήνα) 2013, pp. 64–70.

4. Schreiber, R. D., Cancer Vaccines 2004 opening address: The molecular and cellular basis of cancer immunosurveillance and immunoeditin, *Cancer Immun.*, **2005**, *5*, 1.

5. Dunn, G. P.; Bruce, A. T.; Ikeda, H.; Old, L. J.; Schreiber, R. D., Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape., *Nat. Immunol.,* **2002**, 3, 991-998.

6. Dunn, G. P.; Old, L. J.; Schreiber, R. D., The three Es of cancer immunoediting., *Annu. Rev. Immunol.*, **2004**, *22*, 329-360.

7. Dunn, G. P.; Old, L. J.; Schreiber, R. D., The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting., *Immunity*, **2004**,*21*, 137-148.

8. Ammirati, M.; Vick, N.; Liao, Y.; Ciric, I.; Mikhael, M., Reoperation in the treatment of recurrent intracranial malignant gliomas., *J. Neurosurg.*, **1987**, *21*, 201-206.

9. Ryken, T. C.; Frankel, B.; Julien, T.; Olson, J. J., Surgical management of newly diagnosed glioblastoma in adults: role of cytoreductive surgery, *J. Neurooncol.*, **2008**, *89*, 271-286.

10. Wolf, A. M.; Wender, R. C.; Etzioni, R. B.; Thompson, I. M.; D' Amico, A. V.; Volk, R. J.; Brooks, D. D.; Dash, C.; Guessous, I.; Andrews, K.; DeSantis, C.; Smith, R. A., American Cancer Society guideline for the early detection of prostate cancer: update 2010., *CA Cancer J. Clin.*, **2010**,*60*, 70-98.

11. Steel, G. G., "Basic clinical radiobiology" (3rd ed.), **2002**, Arnold, London.

12. Halperin, E. C.; Perez, C. A.; Brady, L. W., "Perez and Brady's principles and practice of radiation oncology" (5th ed.), **2008**, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

13. Futreal, P. A.; Kasprzyk, A.; Birney, E.; Mullikin, J. C.; Wooster, R.; Stratton, M. R., Cancer and genomics, *Nature*, **2001**, *409*, 850-852.

14. Hunter, T., The Croonian Lecture, The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*,**1998**, *353*, 583-605.

15. Fedi, P.; Tronick, S. R.; Aaronson, S. A., Growth factors. In *"Cancer Medicine"* (Holland, J. F.; Bast, R. C.; Morton, D. L.; Frei, E.; Kufe, D.W.; Weichselbaum, R. R. eds.)., **1999**, Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 41–64.

16. Dachs, G. U.; Dougherty, G. J.; Stratford, I. J.; Chaplin, D. J., Targeting gene therapy to cancer: a review., *Oncol. Res.*, **1996**, *9*, 313-325.

17. Bonnett, R., Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy., *Chem. Soc. Rev.*,**1995**, *24*, 19-33.

18. Ackroyd, R.; Kelty, C.; Brown, N.; Reed, M., The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.*, **2001**, *74*, 656-669.

19. Kennedy, J. C.; Pottier, R. H.; Pross, D. C., Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience, *J. Photochem. Photobiol. B*, **1990**, *6*, 143-148.

20. Hanahan, D.; Weinberg, R. A., The hallmarks of cancer., *Cell*, **2000**,*100*, 57-70.

21. Hanahan, D.; Weinberg, R. A., Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, **2011**, *144*, 646-674.

22. Sonnenschein, C.; Soto, A. M., The aging of the 2000 and 2011 Hallmarks of Cancer reviews: A critique. *J. Biosci.*,**2013**, *38*, 651-663.

23. Dolmans, D. E.; Fukumura, D.; Jain, R. K., Photodynamic therapy for cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, *3*, 380-387.

24. Ames, B. N.; Shigenaga, M. K.; Hagen, T. M., Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1993**, *90*, 7915-7922.

25. Epstein, J. H., Phototherapy and Photochemotherapy, *N. Engl. J. Med.*, **1990**, 322, 1149-1151.

26. Bensasson, R. V.; Jori, G.; Land E.J.; Truscott, T.G., Primary Photo-Processes in Biology and Medicine, Boston, MA: Springer US, 1985.

27. Lipson, R.L., M.Sc. Thesis, University of Minnesota (Minnesota), **1959**.

28. Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Peng, Q., Photodynamic therapy, *J. Natl. Cancer Inst.*,**1998**, *90*, 889-905.

29. Henderson, B. W.; Dougherty, T. J., HOW DOES PHOTODYNAMIC THERAPY WORK?, *Photochem. Photobiol*, **1992**, *55*, 145-157.

30. Moan, J.; Berg, K., The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen, *Photochem Photobiol.*, **1991**, *53*, 549-553.

31. Jiang, F.; Zhang, X.; Kalkanis, S. N.; Zhang, Z.; Yang, H.; Katakowski, M.; Hong, X.; Zheng, X.; Zhu, Z.; Chopp, M., Combination Therapy with Antiangiogenic Treatment and Photodynamic Therapy for the Nude Mouse Bearing U87 Glioblastoma., *Photochem. Photobiol.*,**2008**, *84*, 128-137.

32. Lilge, L. ; Portnoy, M.; Wilson, B. C., Apoptosis induced in vivo by photodynamic therapy in normal brain and intracranial tumour tissue, Br. J. *Cancer*, **2000**, *83*, 1110-1117.

33. Lilge, L.; Olivo, M. C.; Schatz, S. W.; MaGuire, J. A.; Patterson, M. S.; Wilson, B. C., The sensitivity of normal brain and intracranially implanted VX2 tumour to interstitial photodynamic therapy, *Br. J. Cancer*, **1996**, *73*, 332-343.

34. Dougherty, T. J., An Update on Photodynamic Therapy Applications, *J. Clin. Laser Med. Surg.*, **2002**, *20*, 3-7.

35. Origitano, T. C.; Caron, M. J.; Howard Reichman, O., Photodynamic therapy for intracranial neoplasms., *Mol. Chem., Neuropathol.*, **1994**, *21*, 337-352.

36. Stylli, S. S.; Kaye, A. H.; MacGregor, L.; Howes, M.; Rajendra, P., Photodynamic therapy of high grade glioma - long term survival, *J Clin. Neurosci*, **2005**, *12*, 389-398.

37. Webber, J.; Kessel, D.; Fromm, D., Photodynamic Therapy Using Endogenous Photosensitization for Gastrointestinal Tumors., *Yale J. Biol. Med.*, **1997**, *70*, 127-137.

38. Diamond, I.; Granelli, S. G.; McDonagh, A. F.; Nielsen, S.; Wilson, C. B.; Jaenicke, R., Photodynamic therapy of malignant tumours., *Lancet*, **1972**, *2*, 1175-1177.

39. Murphree, A. L.; Cote, M.; Gomer, C. J.; The evolution of photodynamic therapy techniques in the treatment of intraocular tumors., *Photochem Photobiol.*, **1987**, *46*, 919-923.

40. Shumaker, B. P.; Hetzel, F. W., CLINICAL LASER PHOTODYNAMIC THERAPY IN THE TREATMENT OF BLADDER CARCINOMA, *Photochem Photobiol.*, **1987**, *46*, 899-901.

41. Gold, M. H.; Goldman, M. P., 5-Aminolevulinic Acid Photodynamic Therapy: Where We Have Been and Where We Are Going, *Dermatol. Surg.*, **2004**, *30*, 1077-1084.

42. Sachar, M.; Anderson, K. E., Ma, X., Protoporphyrin IX: the Good, the Bad, and the Ugly, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*,**2016**, *356*, 267-275.

43. Donaldson, E. M.; Donaldson, A. D.; Rimington, C., Erythropoietic protoporphyria: a family study, *B.M.J.*, **1967**, *1*,659-663.

44. Cox, T. M.; Alexander, G. J.; Sarkany, R. P., Protoporphyria., *Semin. Liver Dis.*, **1998**, *18*, 85-93.

45. Meerman, L., Erythropoietic protoporphyria. An overview with emphasis on the liver, Scand., *J. Gastroenterol. Suppl.*,**2000**, 79-85.

46. Dailey, H. A.; Meissner, P. N., Erythroid heme biosynthesis and its disorder. *Cold Spring Harb., Perspect. Med.,* **2013,**3, a011676.

47. Chen, F. P.; Risheg, H.; Liu, Y.; Bloomer, J., Ferrochelatase gene mutations in erythropoietic protoporphyria: focus on liver disease, *Cell. Mol. Biol.*, **2002**, *48*, 83-89.

48. Kennedy, J. C.; Pottier, R. H.; Pross, D. C., Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience, *J. Photochem. Photobiol. B*,**1990**, *6*, 143-148.

49. Fukuda, H.; Paredes, S.; Batlle, A. M., Tumour-localizing properties of porphyrins. In vivo studies using free and liposome encapsulated aminolevulinic acid, *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem., Mol. Biol.*, **1992**, *102*, 433-436.
50. Issels, R. D.; Wilmanns, W, Recent Results in Cancer Research.,

Application of Hyperthermia in the Treatment of Cancer, Springer, **1988**.

51. Gullino, P. M.; Grantham, F. H.; Clark, S. H., The Collagen Content of Transplanted Tumors, *Cancer Res.***1962**, *22*, 1031-1037.

52. Abels, C.; Heil, P.;Dellian, M.; Kuhnle, G. E.; Baumgartner, R.; Goetz, A. E., In vivo kinetics and spectra of 5-aminolaevulinic acid-induced fluorescence in an amelanotic melanoma of the hamster, *Br. J. Cancer*,**1994**, *70*, 826-833.

53. Ishizuka, M.; Abe, F.; Sano, Y.; Takahashi, K.; Inoue, K.; Nakajima, M.; Kohda, T.; Komatsu, N.; Ogura, S.; Tanaka, T., Novel development of 5aminolevurinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy., *Int. Immunopharmacol.***2011**, *11*, 358-365.

54. Castano, A. P.; Mroz, P.; Hamblin, M. R., Photodynamic therapy and antitumour immunity., *Nat. Rev. Cancer*,**2006**, *6*, 535-545.

55. Bonkowsky, H. L.; Bloomer, J. R.; Ebert, P. S.; Mahoney, M. J., Heme synthetase deficiency in human protoporphyria. Demonstration of the defect in liver and cultured skin fibroblasts, *J. Clin. Invest*, **1975**, *56*, 1139-1148.

56. Mfouo-Tynga, I.; Abrahamse, H., Cell Death Pathways and Phthalocyanine as an Efficient Agent for Photodynamic Cancer Therapy, *Int. J. Mol. Sci*, **2015**, *16*.

57. Lim, H. W., Mechanisms of phototoxicity in porphyria cutanea tarda and erythropoietic protoporphyria., *Immunol. Ser.*, **1989**, *46*, 671-685. [60]

58. Horton, K. L.; Stewart, K. M.; Fonseca, S. B.; Guo, Q.; Kelley, S. O., Mitochondria-penetrating peptides., *Chemistry & biology*, **2008**, *15*, 375-382.

59. Ross, M.F.; Kelso, G. F.; Blaikie, F. H.; James, A. M.; Cocheme, H. M.; Filipovska, A.; Da Ros, T.; Hurd, T. R.; Smith, R. A.; Murphy, M. P., Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology., *Biochemistry., Biokhimiia*, **2005**, *70*, 222-230.

60. Murphy, M. P.; Smith, R. A., Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations., *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **2007**, *47*, 629-656.

61. Murphy, M. P., Selective targeting of bioactive compounds to mitochondria, *Trends in biotechnology*, **1997**, *15*, 326-330.

62. Smith, R. A.; Porteous, C. M.; Gane, A. M.; Murphy, M. P., Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **2003**, *100*, 5407-5412.

63. Balaji, B.; Balakrishnan, B.; Perumalla, S.; Karande, A. A.; Chakravarty, A. R., Mitochondria-Targeting Photocytotoxic Ferrocenyl Conjugates of N-Alkylpyridinium Salts, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2015**, 1398-1407.

64. Shigenaga, M. K.; Hagen, T. M.; Ames, B. N., Oxidative damage and mitochondrial decay in aging, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **1994**, *91*, 10771-1077.

65. Ketterer, B.; Neumcke, B.; Läuger, P., Transport mechanism of hydrophobic ions through lipid bilayer membranes, *J. Membr. Biol.*, **1971**, *5*, 225-245.

66. Fulda, S.; Galluzzi, L.; Kroemer, G., Targeting mitochondria for cancer therapy, *Nat. Rev. Drug Discovery*,**2010**, *9*, 447-464.

67. Cree, L. M.; Samuels, D. C.; Chinnery, P. F., The inheritance of pathogenic mitochondrial DNA mutations, *Biochim. Biophys. Acta*,**2009**, *1792*, 1097-1102.

 Rin Jean, S.; Tulumello, D. V.; Wisnovsky, S. P.; Lei, E. K.; Pereira, M.
 P.; Kelley, S. O., Molecular Vehicles for Mitochondrial Chemical Biology and Drug Delivery, ACS Chem. Biol., 2014, 9, 323-333.

69. Rottenberg, H., The measurement of transmembrane electrochemical proton gradients, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **1975**, *7*, 61-74.

70. McDonald, J. A., Extracellular matrix assembly, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **1988**, *4*, 183-207.

71. Murphy, M. P., Targeting lipophilic cations to mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, **2008**, *1777*, 1028-1031.

72. Albrecht, H., Chemiluminescence of aminophthalic hydrazide., *Z. phys. Chem*, **1928**, *136*, 321.

73. Barni, F.; Lewis, S. W.; Berti, A.; Miskelly, G. M.; Lago, G., Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection, *Talanta*, **2007**, *72*, 896-913.

74. Gaensslen, R. E., National Institute of, J., *Sourcebook in forensic serology, immunology, and biochemistry*. U.S. Dept. of Justice, National Institute of Justice, **1983**.

75. Harris, L.; Parker, A. S., The Chemiluminescence of 3-Aminophthalhydrazide, *J. Am. Chem. Soc.*,**1935**, *57*, 1939-1942. 76. Laux, D. L., Effects of luminol on the subsequent analysis of bloodstains, J. Forensic Sci., **1991**, *36*, 1512-1520.

77. Grodsky, M.; Wright, K.; Kirk, P. L., Simplified Preliminary Blood Testing. An Improved Technique and a Comparative Study of Methods, *J. Crim. LawCriminol. Police Sci.*, **1951**, *42*, 95-104.

78. McGrath, J., Chemical Luminescence Test for Blood, *B.M.J.*, **1942**, 2, 156-157.

79. Merenyi, G.; Lind, J.; Shen, X.; Eriksen, T. E., Oxidation potential of luminol: is the autooxidation of singlet organic molecules an outer-sphere electron transfer?, *J. Biolumin. Chemilumin.*,**1990**, *5*, 53-56.

80. Castelló.; Francés, F.; Verdú, F., Bleach interference in forensic luminol tests on porous surfaces: More about the drying time effect, *Talanta*, **2009**, *77*, 1555-1557.

81. Barnett, N.; Francis, P., "Chemiluminescence: overview. Encyclopedia of analytical science" (2nd ed.),**2005**,*1*, 506-511.

82. Birks, J. W., "Chemiluminescence and photochemical reaction detection in chromatography", **1989**, VCH Publishers, New York.

83. Campaña, A. M. G.; Baeyens, W. R. G.; Zhao, Y.; Peer Reviewed:
Chemiluminescence Detection in Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.*,**1997**,
69, 83A-88A.

84. Kok, G. L.; Holler, T. P.; Lopez, M. B.; Nachtrieb, H. A.; Yuan, M., Chemiluminescent method for determination of hydrogen peroxide in the ambient atmosphere., *Environ. Sci. Technol.*, **1978**, *12*, 1072-1076.

85. Roda, A. ;Pasini, P.; Guardigli, M.; Baraldini, M.; Musiani, M.; Mirasoli, M., Bio- and chemiluminescence in bioanalysis., *Fresenius J. Anal. Chem.* **,2000**, *366*, 752-759.

86. Kurihara, M.; Hasebe, T.; Kawashima, T., Chemiluminescent methods in analytical chemistry (Review), *Bunseki Kagaku*, **2002**, *51*, 205-233.

87. Yamaguchi, M.; Yoshida, H.; Nohta, H., Luminol-type chemiluminescence derivatization reagents for liquid chromatography and capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, **2002**, *950*, 1-19.

88. Barnett, N.; Francis, P., "Chemiluminescence: overview. Encyclopedia of analytical science" (2nd ed.), **2005**, Elsevier, Oxford.

89. Vish, A.; Yeshion, T. E., The use of Luminol as a presumptive blood test for prehistoric archaeological artifacts., *North American Archaeologist*, **2004**, *25*, 153-159.

90. Tuğ, A., Alakoç, Y. D., Hancı, İ. H., An end to a rumour, Forensic Sci. Int., **2005**, *153*, 156-160.

91. 3-Paradies, Η., The crystal and molecular structure of aminophthalhydrazide (Luminol)., *Berichte* der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie, **1992,**96, 1027-1031.

92. J. Schoelmerich (Ed.), J. Proc. Int. Biolumin. Chemilumin. Symp. 4th Meeting, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 1987, pp. 237–240.

93. Haapakka, K. E.; Kankare, J. J.; Jyrki , A. L., Determination of the second acidity constant of luminol, *Anal. Chim. Acta*, **1982**, *139*, 379-382.

94. Merenyi, G.; Lind, J., Shen, X.; Eriksen, T. E., *J. Phys. Chem.*. **1990**, *94*, 748-752.

95. Weeks, I., "Chemiluminescence Immunoassay.*in* Comprehensive AnalyticalChemistry", (1st ed.), Elsevier, **1992,** Amsterdam.

96. Lind, J.; Merényi, G., Determination of the chemiluminescence quantum yield of luminol in rapid chemical reactions, *Chem. Phys. Lett.*,**1981**, *82*, 331-334.

97. Kricka, L. J., Chemiluminescence and bioluminescence, *Anal. Chem.*, **1995**, *67*, 499-502.

98. Bogert, M. T., Jouard, F. L., 3-AMINO-o-PHTHALIC ACID AND CERTAIN OF ITS DERIVATIVES, *J. Am. Chem. Soc*.**1909**, *31*, 483-490.

99. Brundrett, R. B.; White, E. H., Synthesis and chemiluminescence of derivatives of luminol and isoluminol, *J. Am. Chem. Soc.*,**1974**, *96*, 7497-7502.

100. Yoshimori, O.; Takeo, M.; Seiya, O.; Noboru, S., The Chemiluminescence of Luminol and Acetyl-luminol., *Bull. Chem. Soc. Jpn*,**1967**, *40*, 899-903.

101. Chen, G. N.; Lin, R. E.; Zhuang, H. S.; Zhao, Z. F.; Xu, X. Q.; Zhang, F., Study of electrogenerated chemiluminescence of N-(β-carboxylpropionyl)luminol, *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 375, 269-275.

102. Zhuang, H.S.; Wang, Q. E.; Zhang, F.; Huang, Q. J.; Tang, Y. C., N-(β-Carboxypropionyl)luminol as a new chemiluminescence label in immunoassay, Chin. J. Chem., **1997**, *15*, 123-129.

103. Nakazono, M.; Hino, T.; Zaitsu, K., Photosensitive luminol derivatives and measurement of ultraviolet ray power, *J. Photochem. Photobiol., A*,**2007**, *186*, 99-105.

104. White, E. H.; Roswell, D. F., Chemiluminescence of organic hydrazides., *Acc. Chem. Res.*,**1970**, *3*, 54-62.

105. White, E. H.; Bursey, M. M., Analogs of Luminol. Synthesis and Chemiluminescence of Two Methoxy-Substituted Aminophthalic Hydrazides, *J. Org. Chem.*, **1966**, *31*, 1912-1917.

106. White, E. H.; Bursey, M. M.; Roswell, D. F.; Hill, J. H., Chemiluminescence of some monoacylhydrazides, *J. Org. Chem.*, **1967**, *32*, 1198-1202.

107. Dodeigne, C.; Thunus, L.; Lejeune, R., Chemiluminescence as diagnostic tool. A review, *Talanta*, **2000**, *51*, 415-439.

108. Senning, A., Sulfur Reports. Isothiocyanates in Heterocyclic Synthesis,, Harwood Academic Publishers, **1987**, *8*, 327-454.

109. Menezes, F., PhD thesis, Universidade Techica de Lisboa, (Lisboa), **2010**

110. Yoshida, H.; Nakao, R.; Nohta, H.; Yamaguchi, M., Chemiluminescent properties of some luminol-related compounds— Part 3, *Dyes Pigm.*,**2000**, Vol. 47, 239.

111. Drew, H. D. K.; Pearman, F. H., 132. Chemiluminescent organic compounds. Part IV. Amino- and hydrazino-cyclophthalhydrazides and their relative luminescent power, *J. Am. Chem. Soc.*,**1937**, 586-592.

112. Smanmoo, S.; Nasomphan, W.; Tangboriboonrat, P., Isothiocyanatoluminol as a Chemiluminescence Labeling Reagent for Amino Acids and Proteins, *Chem. Lett.* **2011**, *40*, 188-190.

113. Hintermann, L., Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents. By Zerong Wang, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 2659-2660.

114. Hiegel, G. A.; Faher, D. D.; Lewis, J. C.; Tran, T. D.; Hobson, G. G.; Farokhi, F., α-Chlorination of Carboxylic Acids Using Trichloroisocyanuric Acid, *Synth. Commun.*,**2004**, *34*, 889-893.

115. Joshi, U. M.; Patkar, L. N.; Rajappa, S., Concomitant desulfurization and transesterification of alkyl thionocarbamates, *Synth Commun*, **2004**, *34*,:33-39.

116. Chattaway, F. D.; Tesh, W., LXXVI.-Isomeric phthalylhydrazides. *J. Chem. Soc, Transactions*, **1920**,*117*, 711-720.

117. Drew, H. D. K.; Hatt, H. H.; Hobart, F. A., 6. Chemiluminescent organic compounds. Part III. N-Methylated phthalaz-1 : 4-diones., *J. Chem. Soc.,* **1937**,*0*, 33-37.

118. Drew, H. D. K.; Hatt, H. H., 4. Chemiluminescent organic compounds. Part I. Isomeric simple and complex hydrazides of phthalic acid and mode of formation of phthalazine and isoindole rings, *J. Chem. Soc.*, **1937**,*0*, 16-26.

119. Drew, H. D. K.; Garwood, R. F., 177. Chemiluminescent organic compounds. Part VII. Substituted phthalaz-1 : 4-diones. Effect of substituents on the luminescent power, *J. Chem. Soc.*, **1939**,*0*,836-837.

120. Rodin, R.L.; Drew, H. D. K.; Gershon, H., Photochemical a-chlorination of fatty acid chlorides by thionyl chloride, *J. Org. Chem.*, **1973**, *38*, 3919–3921.

121. Hiegel, G.A.; Abdala, M. H.; Burke, S. V.; Beard, D. P., Methods for preparing aqueous solutions of chlorine and bromine for halogen displacement reactions, *J. Chem. Educ*, **1987**, *64*, 156.

122. Clarke, Oj.; Boyle, R.W., Isothiocyanatoporphyrins, useful intermediates for the conjugation of porphyrins with biomolecules and solid supports, *Chem.Commun.*, **1999**, *21*, 2231-2232.

123. Stross; Fred, H.; Branch; Gerald, E. K., The chemiluminescence of 3aminophthalhydrazide, *J. Org. Chem*, **1938**, *3*, 385-404.

124. Khan, D. Idrees, M. A. Moxley, J. A. Corbett, F. Ahmad, G. von Figura, W. S. Sly, A. Waheed, M. I. Hassan, Luminol-Based Chemiluminescent Signals: Clinical and Non-clinical Application and Future Uses, *Appl. Biochem. Biotechnol,* **2014**, *173*, 333-355.

125. P. B. Shevlin, HA. Ault, "Techniques and experiments for organic chemistry", (6th ed.), **1998**, University Science Book, California.

126. Chattopadhyay, Gautam; RAY, Partha Sinha., Hydrazine-hydroquinone complex as an efficient solid phase hydrazine donor: high yield synthesis of luminol and isoluminol., *J.CHEM. RES.*, **2011**, *35*, 326-328.

127. Williamson, K. L., "Macro scale and micro scale organic experiments", (2rd ed.), **1994,** D.C. Heath, Lexington.

128. Ault, A., "Techniques and experiments for organic chemistry", (6th ed.),1998, University Science Book, California.

129. Huntress, E. H.; Stanley, L. N; Parker, A.S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1934**, *56*, 241.

130. Seligman, A. M.; Wasserkrug, H. L.; Plapinger, R. E.; Seito, T.; Hanker, *Histochem. Cytochem.*, **1970**, *18*, 542.

131. Omote, Y.; Miyake, T.; Ohmori, S.; Sugiyama, N., The chemiluminescence of acyl luminols, *Bull. Chem. Soc. Jp.*, **1966**, *39*, 932-935.

132. Shevlin, P. B.; Neufeld, H. A., Mechanism of the ferricyanide-catalyzed chemiluminescence of luminal, *J. Org. Chem.*, **1970**, *35*, 2178-2182.

133. Hu, J. J.; Wong, N. K.; Ye, S.; Chen, X.; Lu, M. Y.; Zhao, A. Q.; Guo, Y.; Ma, A. C. H.; Leung, A. Y. H.; Shen, J.; Yang, D., Fluorescent Probe HKSOX-1 for Imaging and Detection of Endogenous Superoxide in Live Cells and In Vivo, *J. Am. Chem. Soc.*,**2015**, *137*,6837-6843.

134. Meyer, K.; Voss, E.; Neidlein, R.; Kühnle, H. F.; Pill, J., ω-Substituted alkyl carboxylic acids as antidiabetic and lipid-lowering agents, *Eur. J. Med. Chem.*, **1998**, 33, 775-787.

135. Pefkianakis, E. K.; Christodouleas, D.; Giokas, D. L.; Papadopoulos, K.; Vougioukalakis, G. C., A Family of Rull Photosensitizers with High Singlet Oxygen Quantum Yield: Synthesis, Characterization, and Evaluation, *Eur. J. Inorg. Chem.*,**2013**, *2013*, 4628-4635.

136. Pefkianakis, E. K.; Theodossiou, T. A.; Toubanaki, D. K.; Karagouni, E.; Falaras, P.; Papadopoulos, K.; Vougioukalakis, G. C., A Family of Potent Ru(II) Photosensitizers with Enhanced DNA Intercalation: Bimodal Photokillers, *Photochem. Photobiol.*,**2015**, *91*, 1191.

140